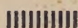
BROTÉRIA

SÉRIE TRIMESTRAL



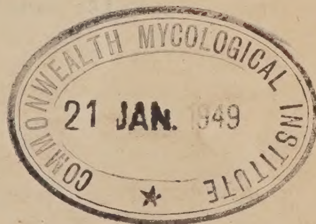
CIÊNCIAS NATURAIS



SUMÁRIO

O Problema da Origem dos Plastídios,
por M. C de Rezende-Pinto.





Publicado em 1 de Fevereiro

VOL. XVII
(XLIV)

LISBOA

FASC. I
1948

Propriedade e edição de
Gaspar Maria Leal Gomes Pereira Cabral

Fundador: J. S. TAVARES
Director: A. LUISIER

BROTÉRIA

SÉRIE TRIMESTRAL

Composta e impressa nas
Grandes Oficinas Gráficas "MINERVA"
Avenida Barão de Trovisqueira
Vila Nova de Famalicão

Redacção e Administração: R. Eugénio dos Santos, 118—Caixa Postal, 364—LISBOA

Avis important: — Tout ce qui concerne la rédaction de cette Série doit être adressé, jusqu'à nouvel ordre, à ***A. Luisier***, **Colégio — Caldas da Saúde — Portugal.**

BROTÉRIA

Composta e impressa nas Grandes
Oficinas Gráficas «Minerva» de
Gaspar Pinto de Sousa, Sucessores,
Limitada — V.ª Nova de Famalicão

BROTÉRIA

Série trimestral: CIÊNCIAS NATURAIS

REVISTA FUNDADA EM 1902 PELOS PROFESSORES J. S. TAVARES, C. MENDES E C. ZIMMERMANN E PREMIADA COM MEDALHA DE OURO NA EXPOSIÇÃO INTERNACIONAL DO RIO DE JANEIRO, EM 1922, E NA EXPOSIÇÃO DO LYCEU DE ARTES E OFFÍCIOS DA BAHIA EM 1914. : : : : : :

DIRECTOR: — A. LUISIER

VOLUME XVII

(XLIV)

LISBOA

1948

O PROBLEMA DA ORIGEM DOS PLASTÍDIOS

POR

M. C. DE REZENDE-PINTO [1]

I — INTRODUÇÃO

A origem dos plastídios constitui, ainda hoje, um dos problemas de citologia vegetal que aguarda solução. As opiniões divergem e cada um põe, na defesa da sua tese, a par de certos argumentos dignos de ponderação, uma boa dose de passionismo, tão contrária ao espírito científico que a ela devia presidir.

Sachs (1873), Mikosch (1885), Belzunch (1887, 1891) atribuíram aos plastídios uma origem citoplasmática.

Meyer (1883), Schimper (1885), Randolph (1922), Geitler (1934) afirmam pelo contrário que os plastídios provêm de outros plastídios pré-existentes por divisão, mantendo a sua individualidade através das diferentes gerações.

Lewitsky (1910), Guilliermond (1911 a-b, 1942), Emberger (1920, 1928), Gonçalves da Cunha (1934) atribuem-lhe uma origem mitocondrial.

Ultimamente, e contràriamente à opinião de Gonçalves da Cunha (loc. cit.), Guilliermond (1942) no seu livro de texto, pág. 130, distingue já, nas plantas verdes, duas categorias de condrioma, os *condriosomas inactivos*, não elaboradores, e os *condriosomas-plastos*, capazes de elaborar, transitória ou temporàriamente, amido, clorofila e carotinóides.

---

(1) Bolseiro do Instituto para a Alta Cultura.

Geitler (1934) baseado no comportamento destes organitos nas plantas inferiores, opõe-se terminantemente a esta concepção dizendo (loc. cit., pág. 37): para que se admitisse a «hipótese da transformação» era-se obrigado, pois, a supor que dois órgãos celulares primitivamente separados filogenèticamente, mais tarde se tornassem semelhantes; hipótese esta que seria tão absurda como a suposição de que núcleo e plastídios se pudessem transformar uns nos outros.

Dado o facto de os métodos mitocondriais, que conheço, corarem do mesmo modo condriosomas e plastídios e, o emprego do corante vital, dito específico, Janusgrün B, ser impraticável na maior parte dos casos, como decidir-nos, com segurança, sobre se estamos em presença de uma ou de outra formação citológica, tratando-se dos diminutos plastídios primordiais e das mitocôndrias?

O problema tem, a meu ver, duas soluções:

1.° — Como é do conhecimento dos citologistas, o ácido acético, quando utilizado em doses mais ou menos elevadas, destrói as mitocôndrias, razão por que, nos fixadores empregados em técnicas mitocondriais, se reduz a duas ou três gotas (Benda, 1902), ou se suprime completamente (Gatenby, 1917 a-b).

Nestas circunstâncias, aplicando ao mesmo material e em idêntico estado de desenvolvimento, dois fixadores, um com, outro sem ácido acético, e submetendo os dois lotes à mesma técnica mitocondrial de coloração, nada mais teremos do que confrontar os resultados: desde que haja absoluta sobreposição de imagens, lógico será concluir que estamos em presença de plastídios e não de condriosomas, no caso contrário nada poderemos afirmar com segurança, visto que dois fixadores diferentes podem dar imagens de fixação muito diversas.

2.° — Aplicando a esta questão o seu método de coloração, tanino-ferro-I, Salazar (1943), diz (loc. cit., pág. 287): «..., si l'on fait exception de la phase finale d'évolution du plastidome, c'est-à-dire, le plaste mûr, tout le plastidome, dès son origine, est tannophile. Cette réaction différentie donc plastidome et chondriome car celui-ci n'est jamais tannophile.»

As minhas observações confirmaram plenamente as de Salazar e, como a seguir se verá, pela introdução de um novo passo na técnica referida, foi possível a coloração diferencial dos cloroplastídios (comp. Rezende-Pinto, 1947).

Contudo, no decurso do presente trabalho, o problema apresentou-se ainda mais complexo do que seria de prever, tratando-se, bem entendido, dos cloroplastídios cuja organização tem sido ùltimamente objecto de profundos estudos (comp. por ex. Heitz, 1932, 1936; Doutreligne, 1935; Menke & Küster, 1938; Frey-Wyssling, 1938, Rabinowitch, 1945).

É certo que estes autores não se preocuparam com a origem destes organitos, aceitaram-nos tal como os encontraram, já formados, preocupando-se exclusivamente com a sua estrutura. Fiel ao meu ponto de vista inicial, a mim pelo contrário, preocupou-me especialmente a sua origem e, num dado momento verifiquei que, por carência de conceitos precisos, estava em face de outro problema não menos delicado do que o primeiro.

Sob o ponto de vista de organização, que relação existiria entre o cloro e o leucoplastídio, de que aquele resultou?

Entre um cloroplastídio e outro elemento qualquer da linhagem plastidial existe apenas uma parte fundamental cuja origem é comum, a parte incolor central, que em certos casos parece faltar completamente, ou, pelo menos, não é visível, e que, nos cloroplastídios, é envolvida pela parte verde, grana e intergrana incolor sendo, todavia, estas últimas formadas, de novo, a expensas do citoplasma envolvente. Portanto, entre um leuco e um cloroplastídio reduzido à expressão mais simples, isto é, à grana e intergrana, não existirá qualquer parentesco.

Por outro lado existe uma semelhança de organização entre a parte fundamental do cloroplastídio, quando presente, e o que nas Anthocerothalles e certas Algas se costuma designar por pirenóide. Nesta conformidade, ou reservamos a designação «plastídio» apenas para os cloroplastídios, designando lògicamente por «pirenóides» os restantes organitos, com exclusão dos condriosomas, ou mantendo-a tere-

mos que designar aqueles por «cromatóforo» (diferente de plastídio).

Evidentemente que uma modificação de nomenclatura, neste sentido, a não ser adoptada simultâneamente por todos os botânicos, seria de consequências catastróficas. Cônscio disso nem tampouco me atrevo a propô-la. A mim, só me interessou precisar conceitos.

II — MATERIAL

As espécies estudadas foram: *Culcita macrocarpa* Pr., *Solanum tuberosum* L. e *Iris germanica* L.

Destas espécies utilizei:

de *Culcita macrocarpa* Pr.: embriões, vértices vegetativos caulinares, radiculares, foliares; soros em diferentes estados de desenvolvimento; esporos jovens, maduros, e em germinação; protalos e gametângios;

de *Solanum tuberosum* L.: tubérculos adultos, primordiais e folhas;

de *Iris germanica* L.: rizomas e respectivos vértices vegetativos.

III — TÉCNICAS

1 — Fixação

Não me parece demasiado insistir em que esta operação preliminar tem importância capital nos estudos citológicos e que, como tal, deve ser aproveitada. Como é sabido, nem todos os fixadores simples ou complexos actuam do mesmo modo sobre os diferentes constituintes protoplasmáticos (comp. por ex. Romeis, 1928; Baker, 1933); há-os que dão boas imagens de fixação de todos os elementos celulares, há-os, pelo contrário, que destróem uns e conservam outros, sem que, por esse facto, prestem relevantes serviços. Do seu conhecimento e escolha criteriosa depende em grande parte o êxito de um trabalho.

Ponderadas razões especiais que oportunamente referirei, o material foi, de harmonia com as circunstâncias, fixado em uma das seguintes misturas fixadoras:

1.º — **Acetoforsaldicr.**: Processo original que consiste na fixação separada e gradual dos constituintes protoplasmáticos. I — imersão das peças em soluto aquoso de ácido acético a 5 %: fixação das núcleoproteinas (24 horas;) II — imersão das peças em formol salgado (formalina, 1 parte; soluto aquoso de ClNa a 3 %, 9 partes): fixação do citoplasma (48 horas); III — lavagem em água corrente (24 horas); IV — imersão das peças num soluto aquoso de dicromato de potássio a 3 % (3-5 dias): fixação dos vacúolos com tanóides. Os resultados obtidos por este processo de fixação levam-me a recomendá-lo para estudos citológicos; dá boas imagens na fixação quer do núcleo quer do citoplasma bem como dos plastídios. Não é recomendável para estudos de condrioma e certos conteúdos vacuolares solúveis no ácido acético.

2.º — **Formol salgado**: Soluto aquoso de ClNa a 3 %, 9 partes; formalina, 1 parte. Tempo de fixação, 1-3 dias. É mau fixador nuclear, razoável fixador do citoplasma com excepção do endoplasma, conservando bem os vacúolos com tanóides e os plastídios. Os condriosomas, segundo Baker (loc. cit., pág. 32) passam da forma de bastonete à de rosário. Para melhor conservação das mitocôndrias aconselham, os manuais de técnica, uma cromização de 8 dias após prévia lavagem em água corrente durante 24 horas. Adicionado de alguns cristais de sulfato ferroso serve simultâneamente de fixador e de indicador dos vacúolos com tanóides (comp. Johansen, 1940, pág. 193).

3.º — **Flemming-Gatenby**: Tetróxido de ósmio a 2 %, 4 partes; ácido crómico a 1 %, 15 partes. Tempo de fixação, 3-8 dias. Justamente reputado como um dos melhores senão o melhor fixador citológico, tem o grande inconveniente de enegrecer os tanóides tão abundantes nos vacúolos das diversas células quer vegetativas quer reprodutoras de *Culcita*.

4.º — **Carnoy (2:1)**: Álcool absoluto, 2 partes; ácido acético glacial, 1 parte. Tempo de fixação, 1/2-1 hora.

Trata-se de uma modificação da fórmula proposta por CARNOY (1886 a), cujo uso está consagrado.

Bom fixador nuclear e dos plastídios, mau fixador do citoplasma que fica profundamente alterado na sua estruturação, dissolve os tanóides vasculares bem como as mitocôndrias.

5.º — **Carnoy (6:3:1):** Álcool absoluto, 6 partes; ácido acético glacial, 3 partes; clorofórmio, 1 parte. Tempo de fixação, 1/2-1 hora.

Modificação original da fórmula proposta por CARNOY (1886 b).

Resultados comparáveis aos obtidos com o *Carnoy (2:1)*.

6.º — **Carnoy-Flemming:** Fixação em uma das misturas de *Carnoy (2:1)* ou *(6:3:1)*, 1/2-1 hora; lavagem em água corrente, 24 horas; imersão em líquido de ***Flemming***, 3-8 dias.

Trata-se de uma dupla fixação que, a exemplo do que anteriormente fizeram outros autores (comp. por ex. SENJANINOVA, 1928) resolvi pôr em prática, a fim de atenuar um pouco os inconvenientes apontados para o *Carnoy*, agravados com o subsequente tratamento pelos alcoóis.

Resultados medíocres, mas superiores aos obtidos com o *Carnoy* simples.

A lavagem após a primeira fixação é absolutamente indispensável, pelo menos neste material, pois evita o enegrecimento total das peças. A explicação do facto parece ser esta: o conteúdo vacuolar muito rico em tanóides é dissolvido pelo *Carnoy*, no qual difunde, espalhando-se, deste modo, pelos diferentes tecidos da peça fixada, indo depois reduzir a ósmio metálico o tetróxido de ósmio do ***Flemming***.

2 — Permeabilização da exina dos esporos

O estudo citológico do esporo maduro ou em estado adiantado de desenvolvimento constituiu, para mim, uma das maiores dificuldades.

A exina dos esporos é, segundo ZETSCHE (1933), constituída por uma substância muito resistente (talvez das subs-

tâncias de origem vegetal a mais resistente; (comp. loc. cit.), absolutamente impermeável, a *esporopolenina (Sporopollenine)*, assim denominada por se encontrar na exina dos esporos e grãos de pólen.

Microquìmicamente, a esporopolenina, é muito semelhante à cutina e suberina, mas tem composição química muito diferente, trata-se de um polímero dos terpenos (comp. loc. cit.).

Enquanto que nos grãos de pólen a exina apresenta um número variável de poros ou fendas germinativas, permitindo assim as observações citológicas durante todo o ciclo de desenvolvimento do micrósporo, nos esporos das pteridófitas constitui uma camada contínua, pelo menos aparentemente.

As reacções da esporopolenina referidas por ZETSCHE (comp. loc. cit.) de nada me aproveitaram; tive por isso que ensaiar novos métodos que me permitissem permeabilizá-la sem alterar profundamente a estrutura íntima do esporo.

Das numerosas técnicas ensaiadas apenas refiro duas, a primeira das quais dá resultados muito satisfatórios.

1.º — **Permeabilização crómica:**

I — Endurecimento do material em álcool a 95 %, durante algumas horas ou poucos dias.

Dada a pequenez dos esporos não é possível trabalhar com eles isoladamente, pelo que se recomenda a utilização de pequenas porções de lobos foliares contendo esporos completamente maduros ou, quando isso se prefira, em estados diferentes de desenvolvimento.

Esta operação preliminar em nada afecta o esporo que, como disse e pude verificar, é impermeável, mas dá à peça uma resistência maior, evitando a sua rápida dissolução no ácido crómico.

II — Lavagem cuidada em água.

III — Imersão do material num soluto aquoso de ácido crómico a 25 %, conservado da estufa à temperatura de 35º C. por um período de tempo que oscila entre 4-7 horas.

O material deve ser vigiado frequentes vezes a partir do limite mínimo de tempo estipulado, considerando-se concluída

a operação no momento em que os soros começam a destacar-se dos segmentos foliares.

A verificação da permeabilização pode fazer-se com simplicidade e segurança, retirando um soro do soluto permeabilizador que, após prévia lavagem rápida em água, se dissocia sobre uma lâmina com duas agulhas de dissecção numa gota de *Sudan III* ou *Scharlach R;* se a exina estiver permeabilizada, os lipidos do esporo coram de vermelho e a operação está concluída.

IV — Lavagem em água corrente, 24 horas.

V — Cromização num soluto aquoso de dicromato de potássio a 3 %, à temperatura de 35° C., durante 8 dias.

VI — Lavagem em água corrente, deshidratação e inclusão rápida em parafina.

A fixação dos esporos é feita pelo ácido crómico e depois pelo dicromato.

2.° — Permeabilização clorídrica:

I — Endurecimento do material.

II — Lavagem cuidada em água.

III — Imersão em ácido clorídrico normal conservado, na estufa, a 35° C., durante 7 dias.

IV — Lavagem em água corrente, 24 horas.

V — Cromização, em $K^2Cr^2O^7$ a 3 %, a 35° C., 8 dias.

VI — Lavagem em agua corrente, 24 horas, deshidratação e inclusão rápida em parafina.

Os resultados obtidos pelos dois métodos de permeabilização serão discutidos adiante, quando nos ocuparmos da citologia do esporo.

3 — Métodos de coloração

Além das técnicas de ALTMANN (1890), BENDA (1902, 1927), BENSLEY (1911), tanino-ferro-I de SALAZAR (1920, 1944), referidas em quase todos os manuais de técnica histológica tive a feliz oportunidade de ensaiar, com sucesso, duas novas combinações com o tanino-ferro (REZENDE-PINTO, 1946 a-b,

1947) e adaptar este à coloração diferencial do plastídio maduro.

Como o seu emprego pode vir a ter interesse em estudos similares, volto a referi-las aqui, tanto mais que surgiram durante e para a elaboração deste trabalho.

1.º — **Tanino-ferro-I-Scharlach R** (técnica empregada e recomendada para o estudo citológico do esporo).

I — Os cortes colados, desparafinados e hidratados são mergulhados no *tanino acético* de SALAZAR: ácido tânico, 6 gr., ácido acético glacial, 10 cc., água destilada, 30 cc., durante 5 minutos.

II — Lavagem em água destilada.

III — Imersão em alúmen de ferro amoniacal a 4 %, 5 minutos.

IV — Lavagem em água destilada.

V — Imersão num soluto alcoólico a 70º saturado de *Scharlach R*, 20 minutos.

VI — Lavagem cuidada em água destilada e montagem em xarope de levulose.

Resultados: núcleo e plastídios corados de negro, lípidos do citoplasma corados de vermelho; rede citoplásmica incolor ou levemente rosada.

Ignoro quais as causas da tanofília do núcleo dos esporos permeabilizados, pois, em todos os outros casos observados, ele apresenta-se nìtidamente tanófobo. É certo que, todas as vezes que antes da fixação se verificam fenómenos de autólise, este deixa de ser tanófobo para se mostrar francamente tanófilo, como refere SALAZAR e eu pude também verificar em material de origem vegetal. Dar-se-á o caso de, a acção do permeabilizador, ser demasiadamente lenta para que o núcleo não seja surpreendido com vida quando este o atinge? Talvez, mas resta demonstrá-lo.

Por outro lado, o *Tanino-ferro-I-Scharlach R* não deve ser considerado como método post-tânico de coloração, visto o tanino não desempenhar aqui acção de mordente para o *Scharlach R*. Este é um corante indiferente que actua específica e independentemente da acção do tanino sobre os lípidos por absorção.

É mesmo possível inverter a ordem da sua actuação, sem que por isso os resultados obtidos deixem de ser idênticos.

2.° — **Feulgen-tanino-ferro-III** (técnica empregada e recomendada para núcleo e plastídios):

I — Fixação em: *Acetoforsaldicr.*, *Formol salgado*, *Canoy* e *Carnoy-Flemming*.

II — Cortes a 10 μ, colados e desparafinados.

III — Lavagem em água destilada.

IV — Imersão em ácido clorídrico normal, à temperatura do laboratório.

V — Hidrólise em ClH normal à temperatura de 58-60° C. durante o tempo de: 2 minutos para o material fixado em *Acetoforsaldicr.* e *Formol salgado*; 4 minutos para o fixado em *Carnoy*.

VI — Imersão em ácido clorídrico normal à temperatura do laboratório.

VII — Coloração em *ácido sulfofucsínico* [1] (comp. por ex. Romeis, 1928, pág. 231) na obscuridade, durante 1 $^1/_2$ hora ou mais.

VIII — Lavagem rápida em água destilada.

IX — Diferenciação e mordimento, a frio, durante 5 minutos em tanino acético de Salazar [2].

X — Lavagem cuidada em água destilada.

XI — Banho de alúmen de ferro amoniacal a 4 %, durante 4 minutos [3].

XII — Lavagem em água.

XIII — Deshidratação, clarificação e montagem em Euparal ou Bálsamo do Canadá.

Resultados: núcleos corados de vermelho-violáceo, nucléo-

(1) Também dá resultados excelentes o derivado aldeídico do ácido sulfofucsínico de Wermel (1925).

(2) Segundo Salazar (1941) o tanino acético, nas colorações pré-tânicas, actua como diferenciador para o corante pré-tânico e realiza, ao mesmo tempo, o mordimento necessário para a actuação do ferro. Nestas circunstâncias suprimiu-se a lavagem em água sulfurosa.

(3) Dá igualmente bons resultados um soluto aquoso de sulfato ferroso (Rezende-Pinto, 1946 c, pág. 124).

los, grânulos amilogíneos dos plastídios e discos clorofilinos dos cloroplastídios corados de negro.

As fibrilas do fuso acromático bem como o Stemmkörper (GEITLER, 1934, pág. 132) mostram igualmente uma tanófila marcada.

A hidrólise antes do *tanino-ferro*, aqui empregada pela primeira vez, como consequência do acoplamento das técnicas de FEULGEN e SALAZAR deu como resultado a coloração específica de três elementos que, sem ela, nunca haviam sido corados: os nucléolos, os grânulos amilogéneos e a grana. Visto a coloração destes elementos ser independente da coloração pelo ácido sulfofucsínico e depender, como referi, apenas da hidrólise preliminar, estamos em face de uma nova técnica cujo alcance não é possível prever.

3.° — **Tanino-ferro-III:**

I-V — Como em *Feulgen-tanino-ferro-III.*

VII — Lavagem em água destilada.

VIII — Mordimento em tanino acético.

IX-X-XI-XII — Como X, XI, XII e XII da técnica anterior.

4.° — **Sulfato de Azul do Nilo:**

I — Fixação em: *Acetoforsaldicr.*, *Formol salgado*, etc.

II — Cortes a 10 μ colados e desparafinados.

III — Lavagem em água destilada.

IV — Coloração, em tubo de Borel, num soluto aquoso saturado de *Sulfato de Azul do Nilo.*

V — Lavagem em água corrente.

VI — Diferenciação em ácido acético a 1 %.

VII — Montagem em xarope de levulose.

Resultados: grana dos cloroplastídios corada electivamente de azul intenso, restantes constituintes celulares levemente corados de azul pálido.

CULCITA MACROCARPA Pr.

(Provas da continuidade da linhagem plastidial)

A — OBSERVAÇÕES NO ZIGOBIONTE

Dada a dificuldade na obtenção de culturas puras de protalos em meios artificiais, tive que recorrer à sua colheita no estado natural. Aí, a par dos protalos de *Culcita macrocarpa* Pr., desenvolvem-se, em condições idênticas, os de outras espécies (comp. Rezende-Pinto, 1943, pág. 128) que com eles podem ser fàcilmente confundidos. Nestas circunstâncias impunha-se a selecção, a qual, pelas razões anteriormente expostas, só foi possível depois de ter ocorrido o desenvolvimento da primeira folha do zigobionte, absolutamente inconfundível. Daqui a impossibilidade de iniciar, como pretendia e seria lógico, as minhas observações pelo estudo do zigoto, tendo que contentar-me com realizá-las em jovens zigobiontes, providos apenas de um cotilédone desenvolvido e fixados ainda à face ventral do protalo (Fig. 1).

Embora excepcionalmente, certos protalos, quando muito bem desenvolvidos, podem apresentar mais do que um zigoto viável. Mercê desta particularidade, foi possível observar o início de segmentação de um zigoto (Est. I, Fig. 1).

Esta observação reveste certa importância, visto vir confirmar a suposição de Eames (1936, págs. 269 e 281) de que o desenvolvimento do embrião das Dicksoniáceas seria idêntico ao das Filicíneas leptosporangiadas.

Como se sabe, as quatro células, em que primeiramente se divide o zigoto, são outras tantas iniciais dos órgãos componentes da jovem planta: haustório, raiz, caule e cotilédone. O estudo de cada uma delas no zigobionte já diferenciado pode bem homologar-se com o que, se não fossem as dificuldades atrás referidas, teria sido levado a cabo em cada um dos quadrantes resultantes da segmentação do zigoto.

O material, constante de vértices vegetativos de raiz, caule e folha, foi fixado em cada uma das fórmulas anteriormente referidas, a fim de se poderem interpretar os resultados. Dois dos fixadores empregados, o *Flemming-Gatenby* e *Formol salgado* seguido de cromização, são fixadores mitocondriais, pelo que não me serviram de base para o estudo dos plastídios,

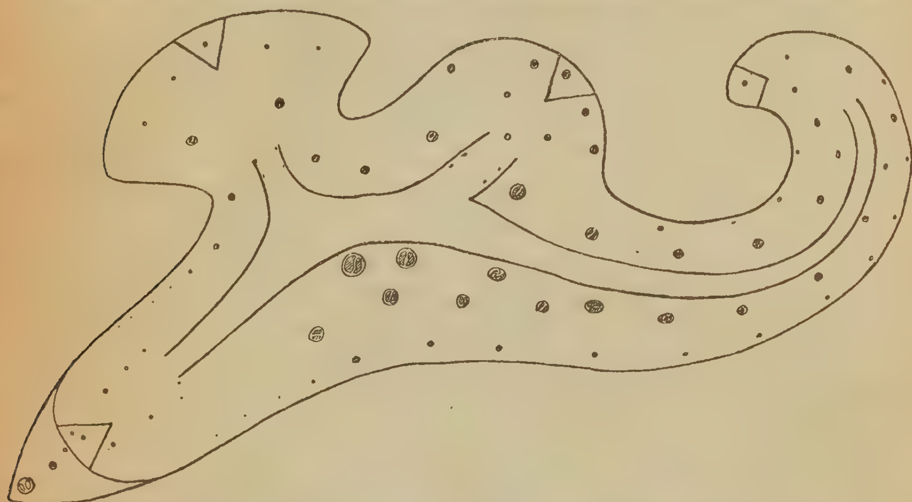


Fig. 1 — *Culcita macrocarpa* Pr. Corte esquemático de um jovem zigobionte tendo localizadas as diversas categorias de plastídios.

apenas como termos de comparação, para maior facilidade e segurança de leitura das preparações.

Dos restantes fixadores, o *Acetoforsaldicr.* é, sem dúvida, o que dá melhores preparações, seguindo-se-lhe o *Carnoy-Flemming*, o *Carnoy 2:1* e, por fim, o *Carnoy 6:3:1*, os quais oferecem a desvantagem de provocar grandes contracções do citoplasma deixando sem apoio os proplastídios e plastídios deste modo sujeitos a perderem-se durante as manipulações.

1 — Raiz

Nos cortes longitudinais medianos dos vértices vegetativos de raiz (Est. I, Fig. 2) distingue-se, a pequena distância da extremidade, uma célula grande, em forma de triângulo

isósceles (a sua forma real é, como se sabe, a de uma pirâmide trigonal com o vértice voltado para a parte superior da raiz), a inicial radicular, provida de citoplasma abundante com pequeníssimos vacúolos com tanóides, fàcilmente evidenciados pelo *Flemming-Gatenby* e *Formol salgado* seguido de cromização, solúveis nos restantes fixadores com ácido acético. No centro desta célula distinguem-se, corados pelo *Feulgen-Tanino-ferro-III*, o núcleo com dois nucléolos e, no citoplasma, numerosos proplastídios.

Nas preparações de *Acetoforsaldicr.*, observadas com grande amplidão, estes proplastídios mostram-se já diferenciados num estroma tanófobo, visível apenas pela sua maior refringência, e um ou dois grânulos tanófilos (Est. I, Fig. 2); nas preparações de *Carnoy 2:1, 6:3:1* e *Carnoy-Flemming* não se nota, pelo contrário, qualquer estruturação, mas em compensação, apresentam-se mais volumosos e mais fortemente tanófilos.

Dado o facto de um e outros fixadores conterem ácido acético não podemos responsabilizá-lo pela falta de estruturação verificada no material fixado nos segundos, a qual deve caber antes ao álcool, componente não comum.

Se examinarmos a preparação partindo da célula inicial para a parte superior da raiz veremos que os proplastídios sensìvelmente idênticos na região promeristemática vão diminuindo, lenta e gradualmente de dimensões, à medida que se realiza a diferenciação dos vários elementos celulares, chegando a atingir os limites da visibilidade microscópica.

Percorrendo a preparação em sentido inverso, isto é, do caliptrogénio para a extremidade da caliptra, notaremos uma evolução rápida mas gradual dos pro- em amiloplastídios, passando, pelo menos nas raízes expostas à luz, por cloro-amiplastídios.

É extraordinàriamente curioso que organitos celulares com origem comum e nas mesmas condições, sigam processos tão diversos de desenvolvimento! Dir-se-ia que aqui, mercê do grau de diferenciação, *a função de absorção é incompatível com o desenvolvimento dos cloroplastídios.*

Entre a primeira raiz e as que se formam depois, com origem no caule, não há quaisquer diferenças de ordem estru-

tural ou citológica, apenas, nesta, a inicial provém de uma célula endodérmica externa, enquanto que naquela representa precisamente uma das quatro células em que se segmentou o zigoto.

Em qualquer dos casos fica demonstrada a origem dos plastídios a partir dos proplastídios da célula apical sem necessidade de recorrer ao processo complicado e pouco lógico da intervenção de outros organitos celulares estruturalmente diversos, como pretendem certos autores (comp. por ex. GUILLIERMOND, EMBERGER, etc., loc. cit.).

2 — Caule

Do mesmo modo que na raiz, todos os tecidos que constituem o caule resultam da divisão de uma célula inicial apical, com a forma de pirâmide trigonal, cujo vértice se encontra orientado para o interior do órgão. Num corte longitudinal mediano vê-se nìtidamente esta célula (Est. I, Fig. 3), uma das quatro em que se segmentou o zigoto, provida de um núcleo volumoso, citoplasma abundante, com numerosos e diminutos vacúolos com tanóides e um grande número de proplastídios mais volumosos do que os que se encontram na inicial radicular.

Da divisão da célula apical resulta imediatamente uma região promeristemática, pouco extensa, com plastídios sensìvelmente idênticos. À medida que esta região promeristemática se vai diferenciando, assim os plastídios evoluem. Dá-se uma involução nos elementos do dermatogénio e pleroma com excepção dos da região medular, quando esta existe (o que só se verifica nos caules adultos, comp. REZENDE-PINTO, 1943, pág. 114 e Fig. 20), onde, bem como no periblema, que vai originar o parênquima cortical, evoluem em amiloplastídios (comp. loc. cit., pág. 112, Fig. 26). Estes amiloplastídios são particularmente volumosos no parênquima cortical interno.

No caule não chegam a desenvolver-se cloroplastídios, o que se explica fàcilmente, pela densa camada de tricomas ful-

vos, que o reveste, impedir a panetração dos raios luminosos (comp. loc. cit., pág. 112, Figs. 3, 4 e 16).

Pelo que acabo de referir, em face dos factos observados, também no caule, não existe qualquer solução de continuidade na linhagem plastidial.

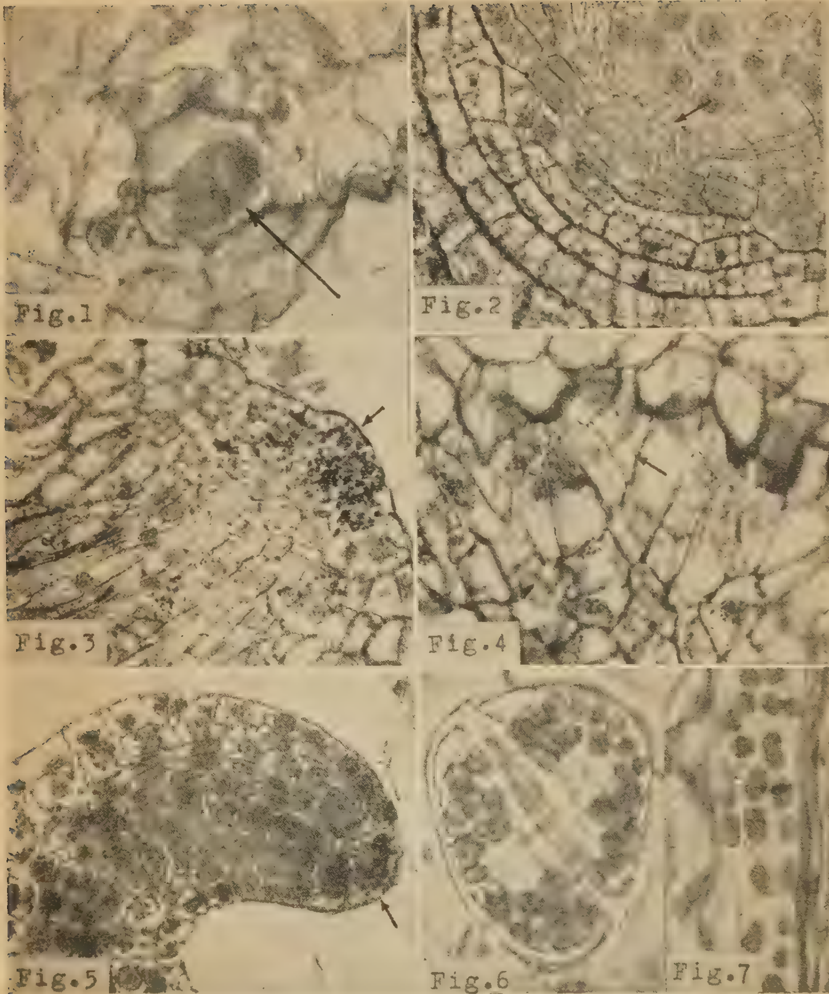
3 — Haustório

O haustório (Est. I, Fig. 4) é um órgão com a figuração de um tronco de cone invertido, com a parte distal em forma de calote esférica, que, nos primeiros tempos do desenvolvimento embrionário, estabelece a comunicação entre o gamo e o jovem zigobionte, de que faz parte.

Nele podem distinguir-se duas regiões: uma, distal, com células grandes, poliédricas, com ângulos muito acentuados, estreitamente aplicadas à face ventral do protalo, providas de pequenos plastídios, sensìvelmente idênticos aos que encontrámos já na região promeristemática da raiz; outra, próximal, com células diversamente diferenciadas, com plastídios maiores.

4 — Fronde

Nas Filicíneas Leptoesporangiadas a fronde tem, sobretudo, crescimento terminal. Se exceptuarmos o cotilédone cuja inicial tem, como o caule e primeira raiz, origem numa das quatro primeiras células resultantes da divisão do zigoto, as outras frondes diferenciam-se a partir de uma célula superficial da região promeristemática do caule, região essa em que, como referi, os plastídios apresentam as mesmas características dos da inicial caulinar. A inicial foliar (Est. I, Fig. 5), célula grande e cuneiforme provida já de plastídios que vistos com grande ampliação se revelam estruturados, distinguindo-se neles uma zona em forma de crescente ou anel, mais ou menos completo, secundàriamente tanófila e uma outra hipotanófila. Na região promeristemática, que se lhe segue, o número das granulações secundàriamente tanófilas aumenta fazendo-se



Culcita macrocarpa Pr. Zigobionte. Fig. 1 — Ventre de um arquegónio encerrando um jovem zigobionte bisegmentado, indicado pela seta. Acetoforsaldicr.; Feulgen-Tanino-ferro-III; × 417. Fig. 2 — Vértice vegetativo radicular cuja célula inicial se encontra indicada pela seta. Acetoforsaldicr.; Feulgen-Tanino-ferro-III; × 270. Fig. 3 — Vértice vegetativo caulinar, célula inicial indicada pela seta. Acetoforsaldicr.; Feulgen-Tanino-ferro-III; × 270. Fig. 4 — Haustório cuja inicial está indicada pela seta. Acetoforsaldicr.; Feulgen-Tanino-ferro-III; × 270. Fig. 5 — Vértice vegetativo foliar. Carnoy (6 : 3 : 1); Feulgen-Tanino-ferro-III; × 270. Fig. 6 — Células oclusivas do estoma, grana invisível, clorofila localizada nas linhas de contacto dos grãos de amido. Observação no vivo; × 1502. Fig. 7 — Células do mesófilo tendo cloroplastídios com grana bem visível. Observação no vivo; × 1502.

assim a transição dos pro- para os leucoplastídios, que se localizam nas diferentes regiões meristemáticas. O seu crescimento ou redução verifica-se à medida que se opera a diferenciação dos tecidos da fronde. Assim, na base do pecíolo podemos seguir a sua evolução em amiloplastídios: nota-se um aumento constante de dimensões dos leucoplastídios que é acompanhado pelo crescimento dos grânulos amilogénios, os quais começam a mostrar-se cavolados devido à acumulação de reservas amiláceas no seu interior. São estes os amiloplastídios primordiais.

Esta estrutura é particularmente posta em evidência pelo *Tanino-ferro-III*, pois a hidrólise em ácido clorídrico dissolve todo o amido aí depositado, ficando apenas o estroma hipotanófilo e, no seu interior, os grânulos amilogénios ocos, de paredes muito espessas e coradas intensamente de negro.

À medida que se depositam novas reservas glucídicas, os grânulos amilogénios aumentam extraordinàriamente de dimensões e ficam reduzidos a uma delgada membrana que, no estado final, difìcilmente se distingue do estroma envolvente.

Relativamente à transformação dos leuco- em cloroplastídios as dificuldades de observação são incontestàvelmente muito maiores.

Dado que a grana e os grânulos amilogénios têm a propriedade comum de se apresentarem secundàriamente tanófilos e visto, no vivo, ser pràticamente inoperável este material, resolvi fazer esse estudo em duas outras plantas, ***Solanum tuberosum*** L. e ***Iris germanica*** L.

Para bem se observar a estrutura dos cloroplastídios basta realizar alguns cortes no limbo com um escalpelo bem afiado e montá-los entre lâmina e lamela numa gota de água glucosada a 5-10 %.

A grana só é bem visível, quando o amido de assimilação ou não existe ou existe em pequena quantidade (Est. I, Fig. 7); quando, pelo contrário, é excessivamente abundante, como sucede com os cloroplastídios das células oclusivas dos estomas ou das células do mesófilo depois de uma longa exposição à luz, a grana deixa de ser visível, notando-se apenas

uma tonalidade esverdeada na região de contacto dos grãos de amido.

Esta falta de visibilidade da grana não deve ser interpretada como modificação da estrutura íntima do cloroplastídio, a qual acarretaria consigo a perda de capacidade funcional: basta a permanência, mais ou menos longa, na obscuridade para que o plastídio recupere o aspecto normal, isto é, tal como o descreve Heitz (1936).

Esta modificação aparente, operada diàriamente, está relacionada com a função assimiladora e auxilia a desvendar algo da sua estrutura íntima: se os discozinhos verdes, cujo conjunto constitui a grana, estivessem apenas disseminados no seio de um estroma lipo-proteico, mais ou menos fluido e sem quaisquer relações de continuidade, não se justificaria o seu deslocamento para os sulcos entre os grânulos amilogénios; deveriam, pelo contrário, continuar disseminados por toda a superfície do referido estroma e do seu afastamento relativo resultaria uma maior visibilidade.

O fenómeno observado só tem explicação se, pelo contrário, admitirmos uma relação de continuidade dos discos clorofilinos, isto é, a existência de uma *intergrana*, proteica, incolor. O cloroplastídio seria, assim, constituído por uma parte fundamental que lhe adviria do leucoplastídio, de que resultou, e de uma outra parte acessória, de origem citoplásmica, formada por uma série de filamentos livres ou anastomosados, em forma de rosário, constituindo a grana e intergrana.

Dado que a elasticidade desta cadeia ou retículo seja pequena, explicar-se-ia o seu deslocamento para os sulcos entre os grânulos amilogénios, por representarem regiões de menor perímetro.

A não visibilidade da grana, em trais circunstâncias, seria devida à falta de poder resolvente do microscópio.

A favor desta hipótese falam certas alterações de estrutura, determinadas por tensões externas e internas, e os casos de desintegração dos cloroplastídios, observados ao microscópio.

5 — Arquídio

Pelo que ficou exposto, vimos não existirem interrupções na linhagem plastidial, dentro do zigobionte; resta verificar a sua continuidade para o gamobionte, cuja célula inicial, o esporo, se origina no interior desse órgão pluricelular, mais geralmente designado por esporângio ou, com mais propriedade, por arquídio.

Não basta, porém, a meu ver, diagnosticar a existência de plastídios no esporo, mesmo jovem; eles poderiam ter evoluído a partir de organitos estruturalmente diversos, como pretendem EMBERGER (1920-1928), SENJANINOVA (1928), ATKINSON (1938), ou formar-se mesmo de novo, a partir do citoplasma, como outrora se pensou (vid. pág. 5). É indispensável segui-los na sua evolução ou involução, do ápice do jovem esporófilo até à placenta, assistir aí à formação e desenvolvimento do arquídio, à formação do arquésporo e, finalmente, à esporogénese.

No esporófilo das *Dicksoniaceae* os soros marginais, bilabiados, originam-se possìvelmente por clivagem dorsi-ventral das iniciais dos segmentos foliares, os quais se tornam, assim, duplos, cada um com a sua inicial própria. Nelas se distinguem os mesmos proplastídios que, no decurso do desenvolvimento do esporófilo, evoluem em cloroplastídios.

Na base do indúsio, na extremidade da nervura, por proliferação nas células superficiais dessa região, forma-se a placenta, tecido meristemático de que vêm a resultar, finalmente, os arquídios e as paráfises (Est. II, Fig. 1).

Ainda em estado muito atrasado do desenvolvimento da placenta as suas células apresentam grandes vacúolos com tanóides que, nas preparações fixadas pelo *Acetoforsaldicr.* (vid. pág. 9) ficam com uma tonalidade amarelo-ouro, devida ao dicromato de potássio, o qual forma com essas substâncias uma laca insolúvel. Os plastídios da placenta primordial são pequeníssimos, e o seu exame bastante difícil devido à presença dos tanóides. O citoplasma acha-se reduzido a fila-

mentos finíssimos, anastomosados, constituindo um retículo de malhas bastante laxas, ao longo ou, de preferência, nos nós do qual estão localizados os proplastídios.

É neste estado de desenvolvimento que, a partir das células superficiais da placenta, se formam os arquídios (Est. II, Figs. 2, 3 e 4) e as paráfises: aqueles por segmentação oblíqua das respectivas iniciais, estas por segmentação transversal. Também aqui não sofre qualquer solução de continuidade a linhagem plastidial.

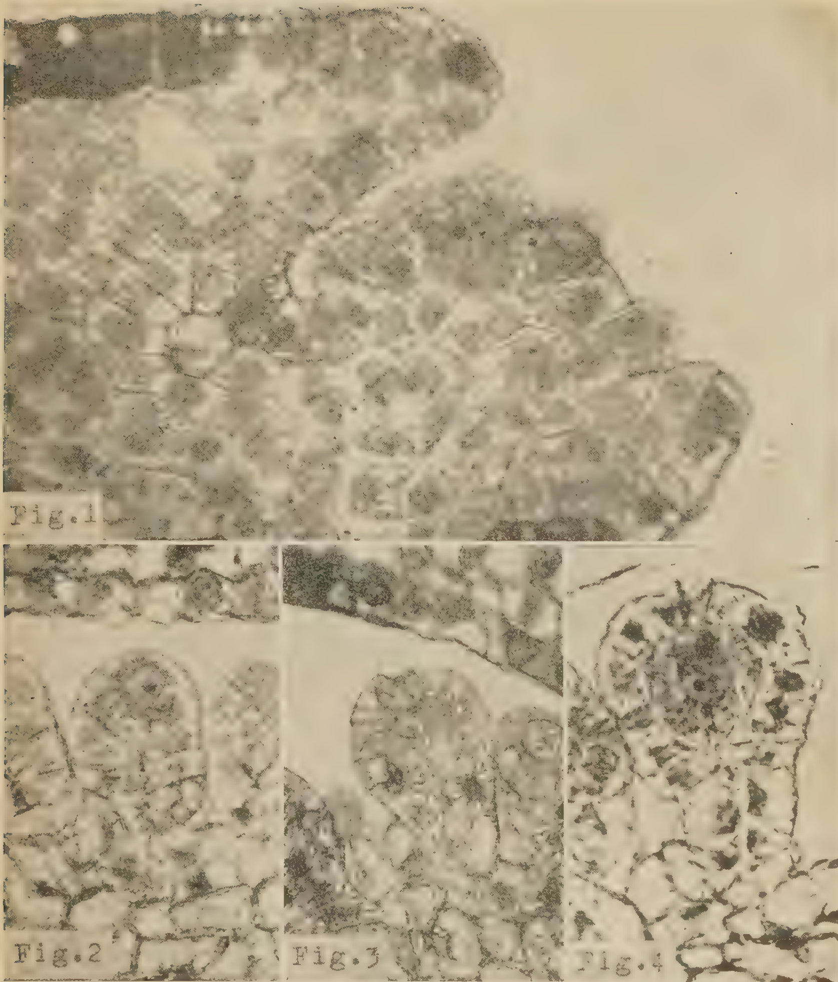
Há, porém, uma diferença na velocidade de evolução destes organitos: maior nas paráfises que nos arquídios e, nestes, afectando apenas as células pediculares e parietais, únicos elementos em que os pro- evoluem em cloroplastídios, como pude verificar em preparações extemporâneas de material fresco. Nas células do arquésporo e do tapete os proplastídios mantêm, pelo menos aparentemente, a mesma configuração inicial.

6 — Esporogénese

Desde o início da profase meiótica até ao fim da segunda divisão de meiose, os proplastídios não sofrem também qualquer modificação apreciável, como pode ver-se consultando as microfotografias (Est. III, Figs. 1 a 6). Quanto ao seu comportamento cinético, se existe, é tão pouco aparente que é impossível reduzi-lo a esquema. De resto, apenas em uma espécie estudada por SENJANINOVA (1928), *Dryopteris parasitica* L. (= *Nephrodium molle* L.), foi até agora descrito um processo cinético, relacionado com o movimento do núcleo, por parte dos organitos do citoplasma (comp. ATKINSON, 1938, pág. 219).

É certo que SENJANINOVA (loc. cit.) diz ter observado esse movimento em organitos celulares de categoria diferente, em condriosomas, identificação essa que, pelas razões anteriormente expostas, necessita ser confirmada.

Embora não possa relacionar-se directamente com o assunto aqui tratado, há um facto referido em trabalho anterior (REZENDE-PINTO, 1943, pág. 122) que, por menos



Culcita macrocarpa PR. Zigobionte. Fig. 1 — Secção longitudinal de um soro muito jovem vendo-se apenas a placenta. Figs. 2, 3 e 4 — Estados sucessivos do desenvolvimento do arquídio. Carnoy (2 : 1); Feulgen-Tanino-ferro-III; × 462.

exacto, me julgo na obrigação de versar novamente aqui. Trata-se do *corpo equatorial fibroso*, formação citológica que aparece constantemente no fim da primeira divisão de meiose, na interfase, e se mantém durante toda a segunda divisão. Pretendi nessa altura homologar as imagens por mim obtidas em material fixado em *Carnoy* e coradas pelo *aceto-carmim* com as de SENJANINOVA (loc. cit.), atribuindo-lhe origem mitocondrial. Na realidade não se trata de qualquer aglomeração de condrioma, mas da dilatação mediana das fibrilas do fuso da primeira divisão devida possìvelmente à sua contracção. Este fenómeno é particularmente evidente no material fixado em *Flemming*, absolutamente confuso no material fixado em *Carnoy* (Est. III, Figs. 4 e 5). O *corpo equatorial fibroso* é de natureza proteica, visto dar, como os pro- e plastídios, reacção tano-férrica positiva nas preparações fixadas em *Carnoy* e *Acetoforsaldicr.*, e possìvelmente também nas fixadas em *Flemming*, logo se tenha acertado com o tempo de hidrólise conveniente para este fixador.

Em todo o caso não se verifica, na interfase, formação de membrana (comp. REZENDE-PINTO & ALICE DE LEMOS PEREIRA, 1947).

B — OBSERVAÇÕES NO GAMOBIONTE

Estas observações constituem, sem dúvida, a parte mais delicada do presente trabalho, pelas dificuldades de ordem técnica que oferecem.

A citologia do esporo maduro, realizada agora pela primeira vez e esboçada já em trabalho anterior (comp. REZENDE-PINTO, 1943, págs. 39-41), é de importância capital. Como veremos, os resultados agora obtidos divergem bastante dos anteriormente expostos (comp. loc. cit.).

O tratamento brutal pelo *licor de Schultz* e pelo *ácido crómico* ferventes, processo técnico então utilizado, deu como resultado não só a destruição dos plastídios e trama citoplásmica, como, por falta de apoio, a deslocação do núcleo para um dos vértices do esporo tetraédrico, ficando este reduzido à expressão mais simples: apenas constituído pela membrana,

núcleo e uma gota lipóidica, quando, na realidade, as coisas se apresentam de modo muito diverso.

1 — Amadurecimento do esporo

No ciclo de desenvolvimento dos esporos de *Culcita macrocarpa* Pr. (e, pelo menos, de mais algumas espécies de Pteridófitas que tive a oportunidade de observar) podem distinguir-se dois períodos relacionados com o desenvolvimento da exina.

O primeiro período, muito curto (poucos dias), caracteriza-se por a membrana do esporo se deixar atravessar fàcilmente pelos fixadores e corantes, permitindo todas as observações citológicas.

O segundo período, muito longo (alguns meses), caracteriza-se pela impermeabilidade da exina, essencialmente constituída, segundo Zetsche (1933), por uma substância muito resistente, a *esporopolenina* (Sporopollenine).

a) **Primeiro período do desenvolvimento do esporo**

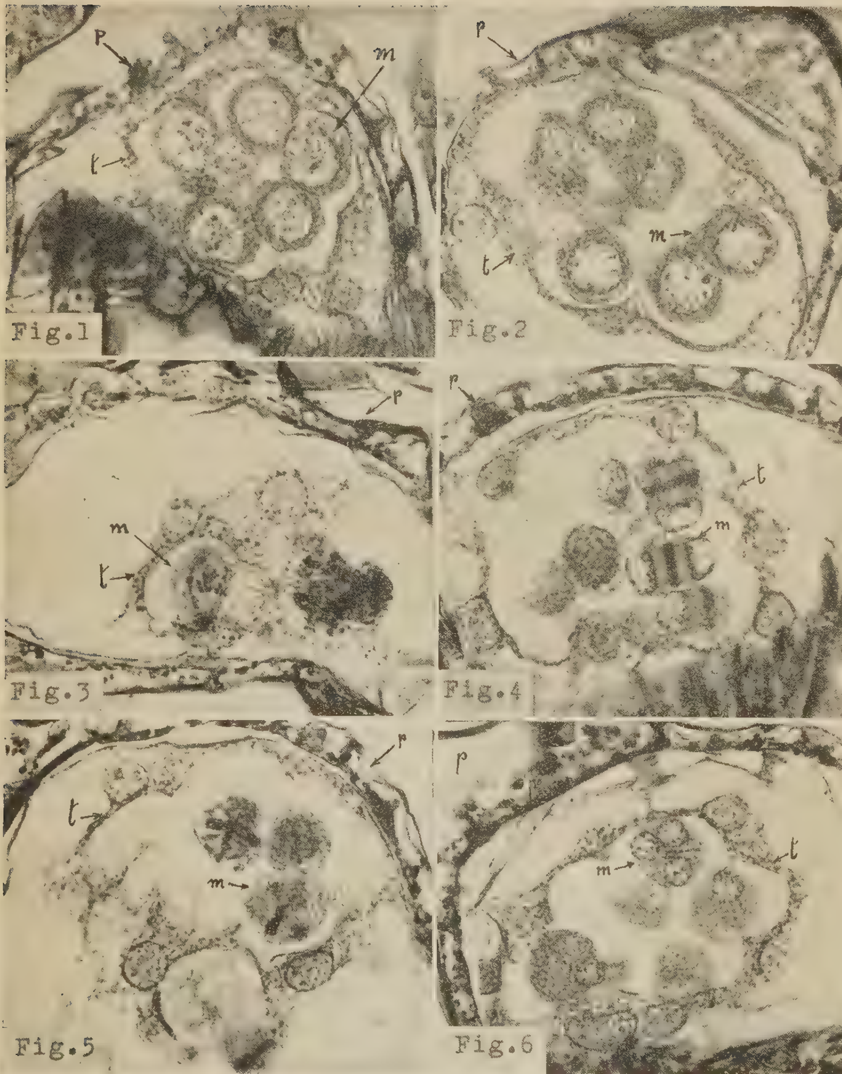
No jovem esporo, recém-formado, a par de um núcleo volumoso, situado no centro da célula, distinguem-se os diminutos proplastídios disseminados irregularmente pelo citoplasma. Neste estado não se observam ainda lipóides.

Num estado um pouco mais adiantado de desenvolvimento nota-se a diminuição de volume do núcleo e a sua deslocação para um dos vértices do esporo tetraédrico. Momentos depois dá-se a impermeabilização da exina, e toda a observação no seu interior se torna impossível, pelos métodos usuais.

Durante este primeiro período de desenvolvimento o esporo pode nutrir-se a expensas do periplasmódio que se insinua, para isso, entre as células mães e, finalmente, entre os próprios esporos. Ele forneceria, assim, os materiais indispensáveis para a elaboração das reservas lipóidicas dos esporos.

b) **Segundo período do desenvolvimento do esporo**

Este segundo período, caracterizado, como disse, pela impermeabilização da exina, deve corresponder também a um



Culcita macrocarpa Pr. Esporogénese. Fig. 1 — Paquítono. Fig. 2 — Diacinese. Fig. 3 — Anafase I. Fig. 4 — Interfase. Fig. 5 — Metafase II. Fig. 6 — Tétrada de esporos: *p*, parede do arquídio; *t*, periplasmódio; *m*, células mães dos esporos. Carnoy (2:1); Feulgen-Tanino-ferro-III; × 414.

Em todas as figuras se vêem as mesmas granulações tanófilas, mais volumosas nas células da parede dos arquídios, mais finas no periplasmódio e citoplasma das células mães ou resultantes da sua divisão meiótica.

estado fisiológico diverso do do primeiro período, caracterizado pela incapacidade ou, pelo menos, pela grande dificuldade em nutrir-se a expensas do periplasmódio, aquisição de independência fisiológica. Na realidade, quando os esporos atingem este estado de desenvolvimento, também o periplasmódio se encontra pràticamente esgotado. Noutras espécies, os restos do periplasmódio vão originar o exospório, essa ornamentação característica de certos esporos, que falta aqui completamente.

Isto não significa que o esporo, uma vez atingida essa independência fisiológica, esteja imediatamente apto a iniciar a germinação. Esta só pode verificar-se depois de um período mais ou menos longo, vulgarmente designado por post-maturação, durante o qual se dão, no seu interior, modificações profundas: crescimento dos plastídios, elaboração de reservas e retomar da posição central por parte do núcleo.

c) **O esporo maduro**

Como referi anteriormente (vid. pág. 11), o melhor agente permeabilizador, até agora ensaiado, é o *ácido crómico* a 25 % a 35° C. As imagens obtidas condizem absolutamente com as que se obtêm em esporos que iniciaram a germinação. A técnica não é isenta de dificuldades, mas compensa inteiramente os cuidados que requer.

Neste estado, além das duas membranas, exina e intina, o esporo apresenta um núcleo, ocupando posição central, envolvido por delgada película citoplásmica, da qual irradiam, para a periferia, finíssimos prolongamentos anastomosados que assim estabelecem a conexão entre o núcleo e a delgada camada de citoplasma que reveste interiormente a intina. Nos nós do retículo citoplásmico estão os plastídios e, banhando as suas malhas, as reservas lipóidicas do esporo (Est. IV, Figs. 2, 3 e 4).

O método de coloração empregado, *Tanino-ferro-I-Scharlach R*, cora, como referi (vid. pág. 13), de negro, o núcleo e os plastídios, de vermelho, os lipidos, ficando a rede citoplásmica incolor ou ligeiramente corada de róseo pálido.

O método de *permeabilização clorídrica* (vid. pág. 12) não revela a estrutura delicada do retículo citoplasmático que

acaba por ser destruído pela acção da hidrólise extraordinàriamente longa (Est. IV, Fig. 1).

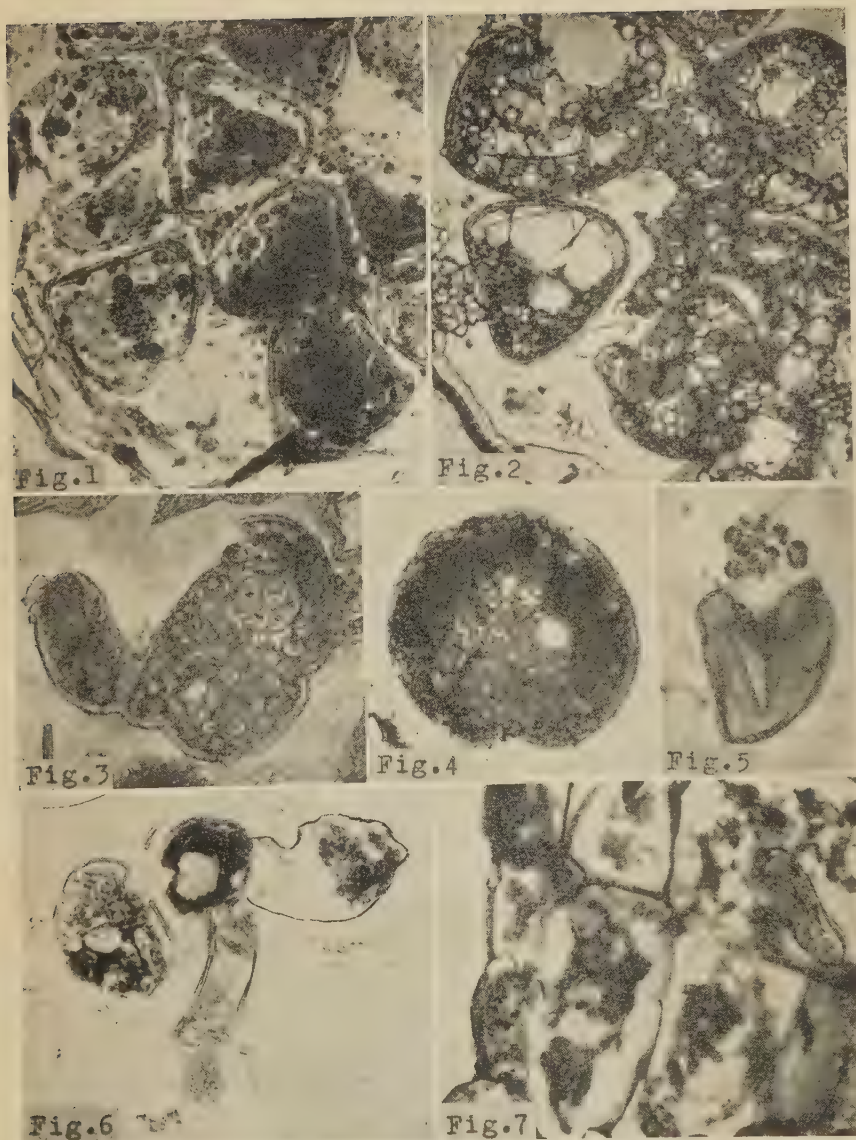
A falta de estruturação, apresentada pelos plastídios, deve-se ao emprego do *Tanino-ferro-I*, que habitualmente a não mostra, tanto mais que, em nenhum caso até agora observado, plastídios com essas dimensões deixaram de a revelar nìtidamente.

Tentei, em vão, corá-los pelo *Tanino-ferro-III*, mas, caso curioso, eles mostraram-se absolutamente refractários a este método de coloração, quer se tratasse de material proveniente da permeabilização crómica, quer do da permeabilização clorídrica.

Finalmente ensaiei um outro método mais expedito, que me deu resultados satisfatórios: uma porção de esporos maduros foi disseminada sobre uma lâmina, porta-objectos, prèviamente albuminizada e flamejada até ao desprendimento de fumos brancos, e esmagados sob a lamela, numa gota fixadora de *Carnoy*, durante 15 minutos aproximadamente, a fim de se produzir a aderência do material e se completar a fixação. Depois introduzi a preparação num tubo de Borrel com água destilada, até ao desprendimento da lamela, e corei pelo *Tanino-ferro-III*. Os resultados obtidos foram os previstos: o estroma incolor e os discos amilogéneos negros (Est. IV, Fig. 5).

Os plastídios dos esporos maduros de *Culcita macrocarpa* Pr. só excepcionalmente têm clorofila, formando-se esta, mais geralmente, no início da germinação. O método seguido para a observação dos cloro- e leucoplastídios dos esporos maduros foi o de esmagamento entre lâmina e lamela numa gota de água glucosada a 5 %.

A formação de clorofila nos esporos deve estar relacionada com a sua localização dentro do arquídio: só os raros esporos situados junto das paredes, mais em contacto com a luz, apresentariam cloroplastídios, enquanto que os outros, situados mais profundamente, não sendo por ela atingidos, não a apresentariam. Trata-se evidentemente de uma hipótese explicativa cuja confirmação me não foi possível realizar por insuficiência das técnicas conhecidas.



Culcita macrocarpa Pr. Fig. 1 — Esporos em cujo interior se vêem os plastídios corados de negro. Permeabilização clorídrica; Tanino-ferro-I-Scharlach R; × 434. Fig. 2 — Esporos em cujo interior se vêem além dos plastídios o retículo citoplásmico. Permeabilização crómica; Tanino-ferro-I-Scharlach R; × 478. Fig. 3 — Esporo gemulado. Permeabilização crómica; Tanino-ferro-I-Scharlach R; × 438. Fig. 4 — Esporo gigante. Permeabilização crómica; Tanino-ferro-I-Scharlach R; × 438. Fig. 5 — Esporo esmagado. Carnoy (2:1); Tanino-ferro-III; × 438. Fig. 6 — Esporos germinados. Kolster; Tanino-ferro-I-Scharlach R; × 499. Fig. 7 — Corte de protalo com o micélio endofítico. Carnoy (2:1); Feulgen-Tanino-ferro-III; × 482.

Além dos esporos normais (Est. IV, Figs. 1 e 2) tive a felicidade de seccionar, também, alguns esporos anómalos (Est. IV, Figs. 3 e 4), cuja génese e morfologia externa constituíram objecto de outro trabalho (REZENDE-PINTO & LEMOS PEREIRA, 1947). Internamente estes esporos são bem configurados: do mesmo modo que os normais, apresentam numerosos plastídios nos nós do retículo citoplásmico que é banhado pelas reservas lipóidicas.

2 — Germinação do esporo

Atingido um certo grau de maturação que, como referi anteriormente (comp. REZENDE-PINTO, 1943, págs. 125-127), não está relacionado com a deiscência do arquídio, os esporos estão aptos a germinar.

A capacidade germinativa dos esporos é relativamente curta, mais ou menos três meses após a deiscência, nas condições normais de luz e humidade. Qualquer destes dois factores, actuando isoladamente, não consegue desencadeá-la, o que, de modo algum, exclui a possibilidade de uma acção anacrónica: de dois lotes de esporos, um em meio húmido e na obscuridade, outro em meio seco e à luz, colocados simultâneamente nas mesmas condições de luz e humidade, germina primeiramente o que se encontrava na humidade e ao abrigo da luz.

Dos esporos anómalos, os gigantes são os únicos incapazes de germinar, pelo menos em todos os casos até agora observados. Como primeiro responsável pela não germinação dos esporos gigantes devemos considerar o núcleo: a possível perda dos centrómeros, tendo já determinado a ameiose da célula mãe, obstaria também à divisão mitótica do núcleo do esporo maduro. Por outro lado, a ausência de fendas germinativas, consequência daquela irregularidade, constituiria não só um obstáculo à entrada de água como à eclosão do esporo.

No momento em que se manifestam os fenómenos externos da germinação, já os leuco- se transformaram em cloro-

plastídios e, nesta categoria, entram depois em divisão, transmitindo-se de célula a célula.

Pelo que respeita às reservas lipóidicas, pode dizer-se que estas permanecem quase todas na primeira célula, passando só uma pequena porção à célula protalar seguinte (Est. IV, Fig. 6). Todos os cloroplastídios possuem, a par da grana, discos amilogéneos (Est. IV, Fig. 7).

Na região mediana e dilatada do protalo encontra-se constantemente um micélio endofítico (Est. IV, Fig. 8), o qual nunca atinge a assentada externa da face superior e em nada afecta a vitalidade do gamobionte. Parece mesmo que este micélio é indispensável ao seu completo desenvolvimento, como parecem demonstrá-lo as experiências por mim realizadas nesse sentido. A ser realmente assim, seria a primeira referência a micélios endofíticos nas *Filicales* (comp. por ex. v. WETTSTEIN, 1944), os quais até agora sòmente haviam sido observados nas *Marattiales*, *Ophioglossales*, *Psilotinae* e *Lycopodiaceae*.

Dada a característica especificidade destes simbiontes, torna-se muito difícil admitir a hipótese não fundamentada de uma subespontaneidade. A admiti-la, seria preciso, lògicamente, colocar em idêntico pé de igualdade outras espécies, como por exemplo o *Lycopodium cernuum* L., cuja área de dispersão é extremamente mais reduzida (comp. REZENDE-PINTO, 1943, pág. 96 e seg., e PIRES DE LIMA & REZENDE-PINTO, 1945, pág. 475 e seg.).

3 — Gametogénese

Na impossibilidade de realizar observações no vivo, em condições tais que fosse possível tirar conclusões seguras, recorri ao método dos cortes por inclusão em parafina. Os protalos foram fixados em *Acetoforsaldicr.*, e os cortes a 10 μ corados pelo *Feulgen-Tanino-ferro-III* (comp. págs. 9 e 14). A orientação preferível a dar aos cortes é a longitudinal; deste modo teremos mais probabilidades de obter secções completas de arquegónios.



Culcita macrocarpa PR. Fig. 1 — Anterídio, divisão nuclear livre. Carnoy (2 : 1); Carmim acético; × 422. Fig. 2 — Anterídio com anterozóides, cada um dos quais possui, além do núcleo enrolado em hélice, uma série de granulações secundàriamente tanófilas. Carnoy (2 : 1); Feulgen-Tanino-ferro-III; × 438. Figs. 3, 4, 5 e 6 — Arquegónios em diferentes estados de desenvolvimento. Acetoforsaldicr.; Feulgen-Tanino-ferro-III; × 442.

Nas Figs. 3 e 4 vêem-se, além disso, dois anterozóides momentos antes da fecundação.

a) **Anterozóides**

Os gâmetas masculinos provêm da respectiva célula mãe, por divisão nuclear livre, seguida de divisão celular múltipla (Est. V, Figs. 1 e 2).

Cada anterozóide possui, a par do respectivo núcleo enrolado em hélice, uma série de pequeníssimas granulações secundàriamente tanófilas que são os plastídios primordiais (Est. V, Figs. 2, 3 e 4). Estes plastídios primordiais ou proplastídios resultaram, indubitàvelmente, dos plastídios da célula mãe, por divisão e redução de dimensões.

É curioso notar que *sempre que numa dada célula ou tecido se verifica uma grande actividade de divisão, os plastídios sofrem uma consequente redução de dimensões;* dir-se-ia que os grandes plastídios constituem um obstáculo à divisão do núcleo: região promeristemática dos vértices vegetativos, células mães dos esporos, e, finalmente, as células mães dos anterozóides.

Embora não tivesse sido possível observar nenhum anterozóide no momento preciso da fecundação, o que teria sido realmente de grande interesse, foram surpreendidos alguns momentos antes de atingirem os arquegónios (Est. V, Figs. 3 e 4) e, nessa altura, ainda conservavam as granulações tanófilas, contrastando perfeitamente com o vermelho violáceo do núcleo helicóidal.

b) **Oosferas**

Os arquegónios, de que apenas o colo emerge do tecido protalar, encerram, além das duas células do canal do colo e da célula do canal do ventre, destinadas a desaparecer no momento da fecundação, cada um a respectiva oosfera provida de um núcleo volumoso e grandes leucoplastídios, em que é possível distinguir perfeitamente o estroma hipotanófilo e os grânulos amilogéneos secundàriamente tanófilos (Est. V, Figs. 3, 4, 5 e 6).

Pelo que ficou dito e documentado microfotogràficamente, também na passagem do gamo- ao zigobionte não houve interrupção da linhagem plastidial, sendo de presumir que os plastídios do jovem esporófita (Est. I, Fig. 1) constituam herança dos dois gâmetos.

SOLANUM TUBEROSUM L.

1 — Génese dos amiloplastídios

Os tubérculos primordiais de uma cultura de batateira foram fixados em *Acetoforsaldicr.* (vid. pág. 9), incluídos em parafina e os cortes a 10 μ corados pelo *Feulgen-Tanino-ferro-III* (vid. pág. 14).

Partindo do vertice vegetativo caulinar, onde se notam os diminutos plastídios primordiais (Est. VI, Fig. 1), para a base do órgão, assiste-se à transformação daqueles organitos em leucoplastídios e destes em amiloplastídios (Est. VI, Figs. 2 e 3).

Os leucoplastídios possuem, regra geral, apenas um grânulo amilogéneo e só raras vezes possuem dois ou mais. No primeiro caso, dão origem a um grão de amido simples; no segundo, a grãos de amido compostos, semi-compostos ou composto-semi-compostos.

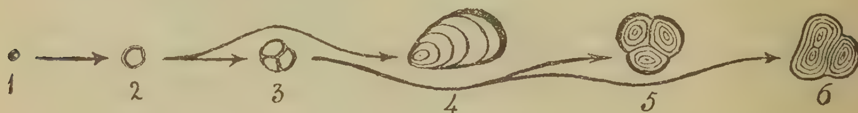
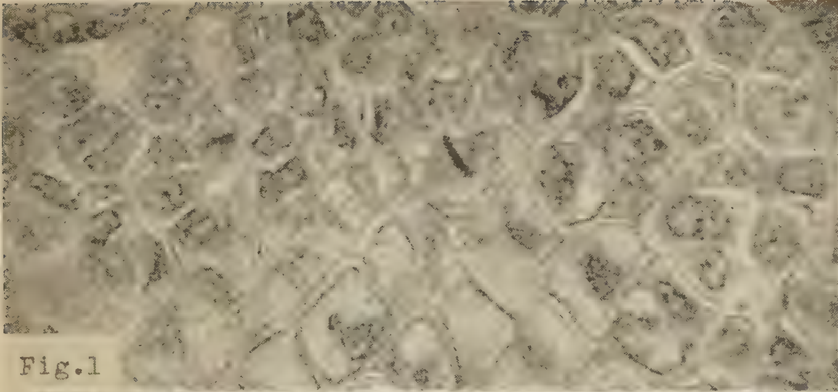
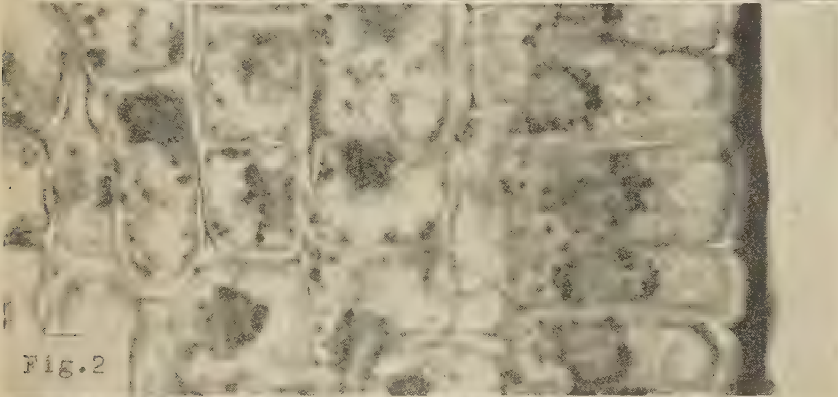


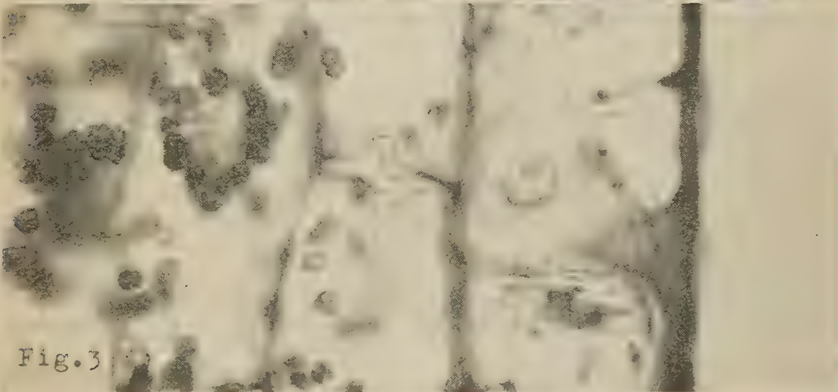
Fig. 2 — *Solanum tuberosum* L. Esquema representativo da génese dos diversos tipos de grãos de amido: 1 — proplastídio; 2 — leucoplastídio com um único grânulo amilogéneo; 3 — leucoplastídio com três grânulos amilogéneos; 4 — grão de amido (= amiloplastídio) simples; 5 — grão de amido composto; 6 — grão de amido composto-semi-composto.

O grânulo amilogéneo, de natureza proteica (?), não tem a mesma espessura em toda a superfície (comp. por ex. GUILLIERMOND, 1941, pág. 439), resultando daí a excentricidade das estrias do grão de amido. Realmente, a coloração pelo *Tanino-ferro-III* revela uma maior intensidade de reacção do grânulo amilogéneo nesse ponto (comp. REZENDE-PINTO, 1946, Est. I, Fig. 2 e aqui Est. VI, Figs. 2 e 3).

A formação dos grãos de amido semi-compostos explicar-se-ia pela rotura de dois ou mais grânulos amilogéneos contíguos, seguida de soldadura dos bordos de cada um, de sorte







Solanum tuberosum L. Vértice vegetativo de um tubérculo e estados sucessivos do desenvolvimento dos plastídios. Fig. 1 — Proplastídios da região promeristemática. Fig. 2 — Leucoplastídios no dermatogéneo e periblema. Fig. 3 — Amiloplastídios primordiais na epiderme e parênquima cortical.
Acetoforsaldicr.; Feulgen-Tanino-ferro-III; ×969.

que, desde esse momento, os referidos grânulos passariam a funcionar como sendo um único grânulo amilogéneo. Se, pelo contrário, algum ou alguns dos grânulos amilogéneos de um dado plastídio não fossem envolvidos neste processo, formar-se-ia um grão de amido composto-semi-composto, segundo o esquema (Fig. 2).

2 — Formação anormal de cloroplastídios no tubérculo

Basta expor um tubérculo à luz, durante alguns dias, para que este adquira a cor verde. O desenvolvimento da clorofila pode seguir-se, com vantagem neste material, no vivo, ou mesmo em preparações definitivas pelo método do *Tanino-ferro-III*. Contudo convém iniciar as observações no vivo, a fim de, mais fàcilmente, se poderem interpretar os resultados obtidos nas preparações definitivas.

Pratica-se uma primeira incisão, normal à superfície exposta à luz, de modo a separar o tubérculo em duas porções, uma das quais pode, depois de talhada convenientemente, ser fixada, reservando-se a outra para o exame imediato. Os cortes podem executar-se, fàcilmente, à mão, com um escalpelo ou navalha de barba bem afiados e observar-se ao microscópio, entre lâmina e lamela, em água glucosada a 5 %.

A primeira transformação operada consiste no aparecimento, à superfície do grão de amido, de uma ou mais vesículas, das quais irradia um retículo, muito delicado, com nós granulosos, a princípio incolores, mas que, dentro em pouco, começam a esverdear cada vez mais intensamente (Est. VII, Fig. 1).

Vesículas e retículo podem, se o grão é pequeno, atingir toda a superfície do amiloplastídio (Est. VII, Fig. 3), se grande, apenas parte dela e, neste caso, de preferência a região oposta ao hilo (Est. VII, Figs. 4, 5 e 6).

Embora não tenha sido possível determinar com absoluta segurança se as vesículas e retículo se formam interior ou exteriormente ao amiloplastídio, estou persuadido de que é exteriormente que eles se desenvolvem, pelas razões seguin-

tes: nas preparações extemporâneas, os numerosos grãos de amido que saem para o exterior do corte nunca trazem agarrada a parte verde (uma e outra formação encontram-se sempre separadamente flutuando no líquido de montagem) (Est. VII, Fig. 2); além disso, os grãos de amido não apresentam nunca quaisquer fragmentos agarrados, nem tampouco simples vestígios de corrosão superficial que possam induzir-me a admitir uma origem endógena. Por outro lado, o exame de preparações definitivas parece conduzir a idênticas conclusões (Est. VII, Fig. 5).

Nestas circunstâncias sou levado a admitir, para os amilo-cloroplastídios, uma origem mista, plastidial e citoplásmica: o citoplasma envolvente do grão de amido, tornado granuloso, diferenciar-se-ia do restante citoplasma, adquirindo, finalmente, os grânulos a cor verde. As pequenas vesículas, descritas anteriormente, seriam vacúolos, mais tarde diferenciados em grânulos amilogéneos.

Os amilo-cloroplastídios dividem-se activamente, mas, neste processo de divisão, apenas a região neo-formada, constituída pela vesícula, grana e intergrana, é interessada. O esquema seguinte (Fig. 3) mostra o desenrolar do processo de divisão.

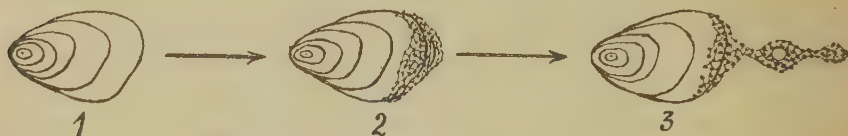
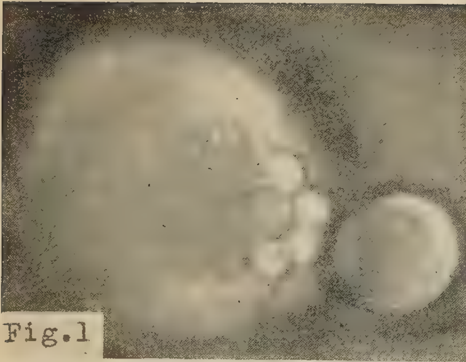
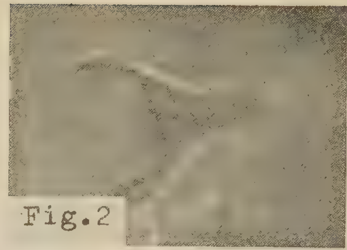


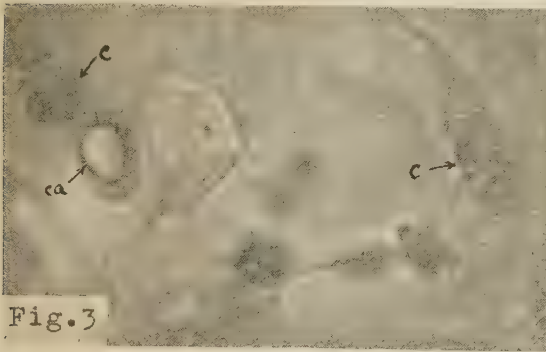
Fig. 3 — *Solanum tuberosum* L. Representação esquemática das transformações operadas nos amiloplastídios por exposição dos tubérculos à luz: 1 — amiloplastídio; 2 — amilo-cloroplastídio; 3 — amilo-cloroplastídio em divisão de que resultam típicos cloroplastídios.

3 — Formação anormal de amiloplastídios nos ramos aéreos

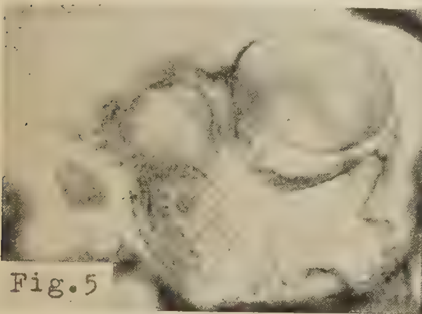
Tendo-me sido comunicado verbalmente por pessoa amiga e digna de todo o crédito que, quando procedia ao arranque das batatas, havia encontrado um «pé com batatinhas na rama», fiquei naturalmente surpreendido com a ocorrência e,

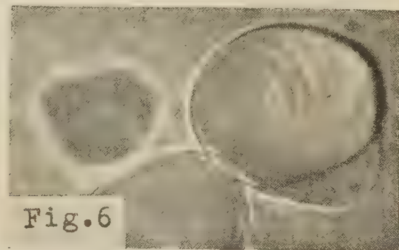












Solanum tuberosum L. Formação dos amilo-cloroplastídios e cloroplastídios num tubérculo exposto à luz. Fig. 1 — Amiloplastídio mostrando o desenvolvimento, à sua superfície, das vesículas e retículo citoplásmico. Observação vital; × 876. Fig. 2 — Porção verde, constituída pela grana e intergrana, de origem citoplásmica e destacada por ligeira pressão de um amiloplastídio. Observação vital; × 876. Fig. 3 — *ca*, Amilo-cloroplastídio; *c*, cloroplastídios típicos resultantes da divisão dos amilo-cloroplastídios. Observação vital; × 876. Fig. 4 — Cloro-amiloplastídio cuja grana se prolonga para além do grão de amido sob a forma de granulações incolores similares. Observação vital. Fig. 5 — Amilo-cloroplastídios. Acetoforsaldicr.; Feulgen-Tanino-ferro-III; × 876. Fig. 6 — Amilo-cloroplastídios. Observação vital; × 876.

ao mesmo tempo, muito penalizado por me não ser possível observar a referida planta, a esse tempo já inutilizada.

Este curioso fenómeno poderia ter sido produzido por um virus ou por uma larva; aquele obturando o floema, esta destruindo-o, na sua voracidade, juntamente com os outros tecidos moles. Como quer que fosse, não me seria dado observar possìvelmente a sua repetição, pelo que logo pensei provocá-lo.

Atendendo a que nos caules das Solanáceas existem duas assentadas de floema primário, situadas uma interna, outra externamente ao xilema (comp. por ex. Eames and McDaniels 1925, pág. 252, Fig. 115), procedi do modo seguinte: — *a)* eliminação do floema externo pela simples remoção de um anel de casca, um pouco acima do nível do solo; — *b)* eliminação do floema interno por meio de uma agulha de dissecção introduzida na região descorticada à qual se imprimem movimentos em todas as direcções de modo a inutilizar todos os tecidos até ao xilema, o qual deve ser o menos danificado possível.

Após esta operação a planta continua a viver, como se nada tivera sofrido; mas, decorridos alguns dias, as folhas da base começam a apresentar os primeiros sintomas de envelhecimento: amarelecem, secam e, por fim, caem. Neste momento, os gomos latentes das axilas destas folhas desenvolvem-se ràpidamente e originam pequenos ramos, muito curtos e terminados por uma coroa de pequeninas folhas verdes, os quais, por engrossamento mediano do eixo, degeneram em tubérculos ovóides, geralmente pequenos e intensamente corados de vermelho violáceo (Est. VIII, Fig. 1, indicados pelas setas).

Os ramos que no momento da operação se encontravam já em desenvolvimento, não originam nunca verdadeiros tubérculos, podendo, quando muito jovens ainda, apresentar um leve entumescimento basal (Est. VIII, Fig. 1, indicado pela seta dupla).

Da base dos tubérculos saem numerosos estolhos que, dentro em pouco, originam outros tantos tubérculos, análogos aos primeiros.

O exame microscópico de um desses tubérculos, em secção longitudinal, no vivo, mostrou, nas assentadas mais externas, a existência de grandes vacúolos com pigmentos antociânicos, que protegem as células internas da acção dos raios luminosos, permitindo a transformação dos cloro- em amiloplastídios.

Na epiderme e assentadas subjacentes encontram-se verdadeiros cloroplastídios com grana bem visível (Est. VIII, Fig. 2). Nas assentadas seguintes encontram-se todos os elementos de transição entre estes e os amiloplastídios, que ocupam a maior parte do tubérculo (Est. VIII, Fig. 5). Estes elementos de transição são os cloro-amiloplastídios (Est. VIII, Figs. 3 e 4) muito semelhantes aos amilo-cloroplastídios, que descrevi, nos tubérculos normais, quando expostos à luz.

À medida que se verifica o aumento de volume dos grânulos de amido, a grana torna-se cada vez mais distanciada e, num dado momento, deixa de os envolver completamente, acabando por se dispor ao longo dos sulcos, entre os grânulos, se são compostos, ou lateralmente, se são simples. Finalmente deixa de ser visível, subsistindo, apenas temporàriamente, uma zona esverdeada que acaba também por desaparacer. Neste momento estamos em presença dos verdadeiros amiloplastídios, em tudo idênticos aos que se encontram nos tubérculos normais.

Neste estado intermediário do cloro-amiloplastídio foi possível observar um facto muito curioso de perda de individualidade da zona verde, motivado pela fusão da grana e intergrana dos diferentes organitos (Est. VIII, Fig. 4).

O esquema seguinte (Fig. 4) resume a série de transformações observadas.

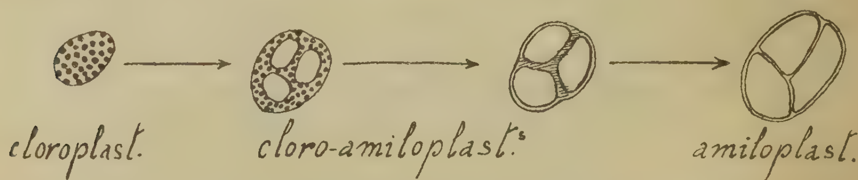
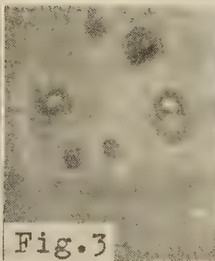
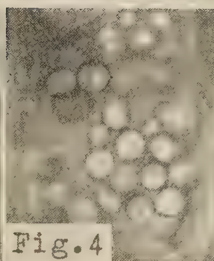


Fig. 4 — *Solanum tuberosum* L. Génese dos amiloplastídios dos tubérculos caulinares aéreos.

Fig.1



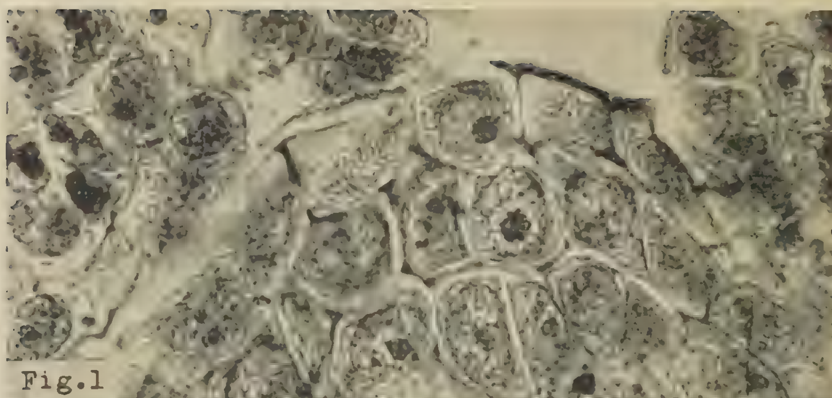


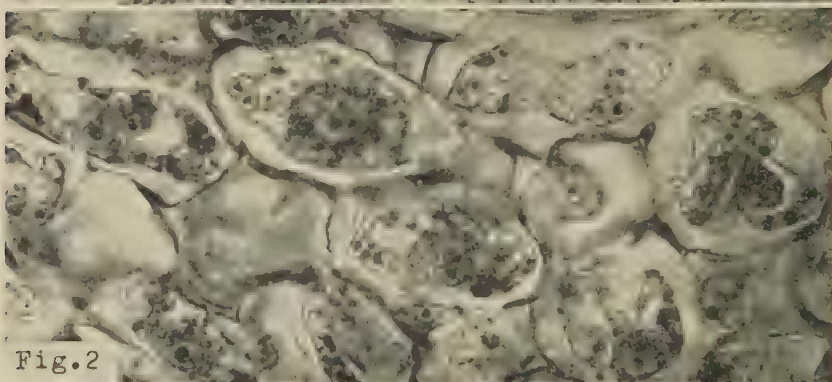


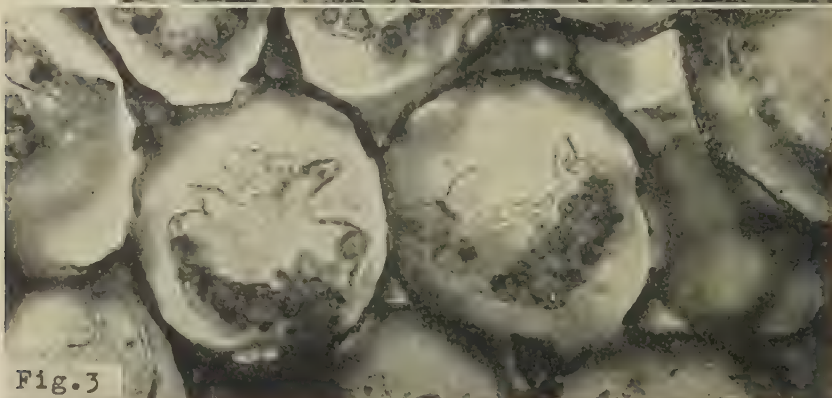


Solanum tuberosum L. Formação de amilo-cloroplastídios e amiloplastídios nos ramos aéreos. Fig. 1 — Porção basal de uma planta com tubérculos caulinares aéreos, indicados pelas setas. Fig. 2 — Cloroplastídios da região externa. Fig. 3 — Cloro--amiloplastídios de uma região mais profunda. Fig. 4 — Cloro-amiloplastídios coalescentes. Fig. 5 — Amiloplastídio.

Observação vital; $\times$ 1635.







Iris germanica L. Vértice vegetativo do rizoma. Fig. 1 — Região promeristemática com proplastídios. Fig. 2 — Periblema com leucoplastídios. Fig. 3 — Parênquima cortical com amiloplastídios primordiais.
Acetoforsaldicr.; Feulgen-Tanino-ferro-III; × 876.

IRIS GERMANICA L.

1 — Génese dos óleoplastídios

Os vértices vegetativos caulinares, acompanhados de uma porção rizomatosa, depois de fendidos longitudinalmente, para facilitar a penetração dos reagentes, foram fixados em *Acetoforsaldicr.* e em *Flemming-Gatenby* (vid. pág. 9), incluídos em parafina, cortes a 15 μ, corados respectivamente pelo *Feulgen-Tanino-ferro-III* (vid. pág. 15) e pelo *Tanino-ferro-I-Scharlach R* (vid. pág. 13).

No vértice vegetativo caulinar notam-se os característicos plastídios primordiais, muito pequenos, que cedo se transformam em leucoplastídios e, estes, em amiloplastídios, em tudo muito semelhantes aos de *Solanum tuberosum* L. (Est. VII, Figs. 1, 2 e 3, e Est. IX, Fig. 1).

Contràriamente ao que se observa no tubérculo de *Solanum tuberosum* L., em que os amiloplastídios representam o estado final de evolução daqueles organitos, em *Iris germanica* L. e, muito possìvelmente, noutras espécies com ela aparentadas, não termina aqui essa evolução; os amiloplastídios, em dado momento, transformam-se gradualmente em óleoplastídios. Na região oposta ao hilo aparecem pequeníssimas vesículas lipóidicas, separadas umas das outras por uma malha delicada de natureza proteica (Est. IX, Figs. 2 e 3).

Esta transformação dos amilo- em óleoplastídios pode seguir-se fàcilmente, no vivo; à medida que o grão de amido diminui, aumenta o número de vesículas lipóidicas, até completo desaparecimento daquele.

As reservas glucídicas transformam-se, assim, completamente em lipídicas, de valor energético muito superior e ocupando espaço sensìvelmente menor (Est. IX, Figs. 1, 2 e 3).

Segundo Wattiez et Sternon (1935, pág. 483) o mecanismo da lipogénese é pouco mais que desconhecido, presumindo-se, que primeiramente se formarão glicerol e áci-

dos gordos, de cuja combinação ulterior resultariam os glicéridos.

A génese dos óleoplastídios pode seguir-se no esquema seguinte.

proplast. leucoplast amiloplast. amilo-óleoplast. óleoplast. óleo-cloroplast. cloroplast.
amilo-cloroplast.

Fig. 5 — *Iris germanica* L. Génese dos cloroplastídios no rizoma, quando exposto à luz.

2 — Formação anormal de cloroplastídios

Nos rizomas de *Iris germanica* L., natural ou propositadamente expostos à luz, do mesmo modo que em *Solanum tuberosum* L. pode provocar-se o desenvolvimento anormal de clorofila. Porém a génese dos cloroplastídios, neste material, é muito mais curiosa do que nos tubérculos daquela planta.

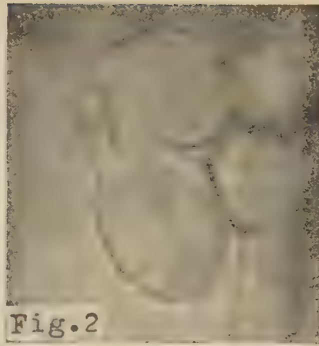
De um modo geral, os amiloplastídios não chegam a transformar-se em amilo-cloroplastídios, como em *Solanum tuberosum* L., pela simples razão de se encontrarem naturalmente ao abrigo da luz, protegidos pelas folhas.

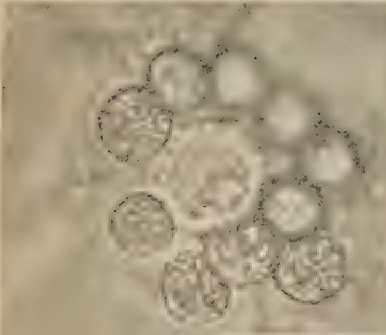
Para se conseguir tal transformação temos que colocar, prèviamente, essa região em contacto com a luz, despindo-a o mais possível de folhas.

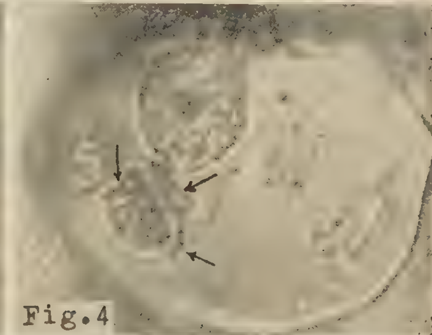
A transformação dos óleoplastídios em óleo-cloroplastídios é mais fàcilmente observável, visto estes se encontrarem numa maior extensão e não requererem mais que a simples exposição à luz: à superfície dos óleoplastídios, esféricos, começa a desenvolver-se uma calote citoplasmática, cada vez mais granulosa, cujas granulações acabam por adquirir a cor verde, e que, por progressão dos seus bordos, acaba por envolver completamente o óleoplastídio (Est. X, Figs. 4, 5 e 6).

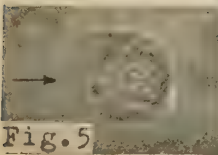
Contràriamente ao que sucede na transformação dos amilo- em amilo-cloroplastídios, em que se não verifica a diminuição aparente das reservas glucídicas daqueles, na













Iris germanica L. Formação dos óleoplastídios e dos óleo-cloro- e cloroplastídios pela exposição à luz do rizoma. Fig. 1 — Amiloplastídios. Fig. 2 — Amilo-óleoplastídios. Fig. 3 — Óleoplastídios. Figs. 4 e 5 — Óleo-cloroplastídios; a parte verde, indicada pela seta, envolve imperfeitamente a parte proteico-lipídica do óleoplastídio.
Fig. 6 — Cloroplastídios normais.
Observação vital; × 1635.

transformação dos óleo- em óleo-cloroplastídios a diminuição das reservas lipídicas é manifesta (Est. X, Figs. 4, 5 e 6).

De uma maneira mais evidente do que em *Solanum tuberosum* L. pode ver-se que a grana e intergrana resultaram de uma diferenciação do citoplasma envolvente do óleoplastídio.

V — DISCUSSÃO

Pela leitura das páginas antecedentes se depreenderá que tomei abertamente o partido de MEYER (1883), SCHIMPER (1885), RANDOLPH (1922), GEITLER (1934), etc., isto é, que ***os plastídios constituem uma linhagem de organitos celulares sem qualquer relação de parentesco com o condrioma.*** Procurei ser o mais objectivo possível como se pode ver pelo documentário microfotográfico que ilustra o presente trabalho.

Propositadamente deixei para esta altura a discussão da parte que reputo fundamental, — os métodos.

Comecemos pela fixação: A razão de ter dado preferência às misturas fixadoras à base de ácido acético proveio do facto conhecido de que este líquido destrói as mitocôndrias (comp. por ex. BENDA, 1902, GATTENBY, 1917 a-b, e qualquer livro de técnicas). Em todos os materiais que serviram de base a este estudo, utilizei vários fixadores, entre eles o de *Carnoy (6:3:1)* e *(2:1)* por ser o que continha ácido acético em mais elevada percentagem, por conseguinte o que me dava maior certeza de resultados: ***aceto-resistência de todos os elementos da linhagem plastidial.***

Esta aceto-resistência já por si revela certas diferenças de composição das duas categorias de organitos em questão, plastídios e condriosomas, e, a meu ver, seria bastante para os distinguir. Tive, porém, a oportunidade de prosseguir as investigações iniciadas por SALAZAR (comp. 1943, 1945 e bibl. aí cit.), aplicando o seu método de coloração *Tanino-ferro-1,* a que depois introduzi modificações (vid. págs. 13-15).

O quadro das substâncias tanófilas é muito vasto e constituiu já objecto de estudo de SALAZAR (1941, págs. 51-52). O conceito de tanófila, embora não definitivamente estabele-

cido, implicava uma afinidade de ordem química da substância para o tanino acético, formação do complexo tano-proteico (comp. loc. cit., pág. 45) (1).

Se bem que a hipótese primitiva de se tratar de uma reacção puramente química não possa pôr-se inteiramente de parte, estou hoje convencido de que, na grande maioria dos casos, se trata de uma simples reacção física. É meu intento dar a esta questão o relevo e o desenvolvimento que ela requer, contudo os factos até agora observados permitem-me já fazer algumas deduções aplicáveis ao presente trabalho. Além dos plastídios e dos nucléolos dão reacção positiva pelo tanino-ferro as membranas esqueléticas das células vegetais de natureza celulósica, e reacção negativa, todas as membranas lenhificadas e suberificadas.

Tendo presentes as lições do Prof. Dr. Frey-Wyssling sobre a estrutura submicroscópica da membrana vegetal, fàcilmente se chegará à explicação do referido fenómeno de coloração: *só dão reacção positiva as membranas celulares cujos espaços intermicelares se encontram vazios de qualquer substância sólida,* isto é, as membranas celulósicas; aquelas cujos espaços intermicelares se encontram já preenchidos por suberina, linhina ou cutina, não coram. Nas primeiras há lugar onde fàcilmente se instalem as micelas da solução colóidal de tanino acético, o qual, reagindo depois com o ferro, dará o precipitado negro de tanato de ferro. Nas últimas, em que os espaços intermicelares se encontram já preenchidos por aquelas substâncias, não há lugar para mais nada. Em última análise, estaríamos reduzidos ao conhecido caso de coloração pelo Genebrês.

---

(1) Variadíssimas vezes, antes do meu estágio no Pflanzenphysiologisches Institut der E. T. H. Zürich, abordámos, Salazar e eu, este problema, mas sempre sem qualquer resultado. No dia em que, após o meu regresso, lhe escrevia, expondo-lhe o meu ponto de vista, e propondo-lhe, ao mesmo tempo, um trabalho de conjunto, a realizar possìvelmente de colaboração, finava-se, em Lisboa, o Mestre e Amigo que foi para mim o Prof. Abel Salazar.

Nestas condições, *o método do Tanino-ferro não só permite distinguir as duas categorias de granulações, como revela, além disso, uma identidade de estruturação submicroscópica dos diversos elementos da linhagem plastidial.*

Fica assim duplamente justificada a minha posição ante o problema que me propus resolver.



Nas células que constituem os promeristemas e nas células mães de esporos e anterozóides encontram-se apenas plastídios primordiais ou proplastídios (RANDOLPH, 1922), parecendo que *as dimensões destes organitos estão de algum modo relacionadas com a actividade de divisão das referidas células.* Por outro lado nota-se uma tendência muito nítida para se acumularem junto do núcleo, envolvendo-o. A polaridade marcada destes elementos não tem carácter exclusivo, antes constitui propriedade geral de quase todos os tipos de plastídios, excepção feita aos cloroplastídios que geralmente se encontram dispersos por toda a célula.

Os leucoplastídios, bastante maiores e nìtidamente estruturados, providos de um estroma hipotanófilo e de um ou mais grânulos amilogéneos secundàriamente tanófilos, encontram-se nas regiões meristemáticas e em certos tecidos definitivos. Quando o núcleo entra em divisão repartem-se em dois lotes ocupando cada um o seu polo, — *plastocinese.*

Dos leucoplastídios podem, por um lado, resultar imediatamente os cloroplastídios, como sucede nas folhas dos vegetais verdes, ou os amiloplastídios de certos órgãos de reserva. Entre os amilo- e os leucoplastídios, de que resultaram os cloroplastídios, existem sempre certos elementos de transição que designei por amiloplastídios primordiais. Nestes, os grânulos amilogéneos apresentam-se cavolados e de contornos muito espessos.

Os amiloplastídios dos tubérculos de *Solanum tuberosum* L., expostos à luz, transformam-se em amilo-cloroplastí-

dios, os quais, por divisão, originam verdadeiros cloroplastídios.

Em *Iris germanica* L. e possìvelmente noutras espécies daquele e outros géneros, as reservas glucídicas cedo se transformam em lipídicas; os amiloplastídios dos rizomas transformam-se em óleoplastídios, passando pela categoria intermédia de amilo-óleoplastídios.

Expostos à luz, os óleoplastídios originam também cloroplastídios, aparecendo, como estado intermédio, o de óleo-cloroplastídios.

A formação de cloroplastídios nos órgãos de reserva, tubérculos de *Solanum tuberosum* L. e rizomas de *Iris germanica* L. pôde ser fàcilmente estudada no vivo com o cuidado requerido, chegando-se à conclusão de que *a grana e intergrana se formam a expensas do citoplasma envolvente* dos amilo- ou óleoplastídios. *A existência de um substrato glucídico parece constituir condição indispensável ao desenvolvimento dos cloroplastídios;* na sua ausência jamais se verificaria o aparecimento destes organitos.

Entre os grânulos amilogéneos e a grana, não obstante ambos darem reacção positiva pelo tanino-ferro, não existe qualquer relação de parentesco: a grana tem origem citoplasmática e, pela presença de clorofila, desempenha função fotosensibilizadora; os grânulos amilogéneos de origem plastidial, comparáveis possìvelmente aos pirenóides de certas algas, constituirão o lugar onde se realiza a síntese dos glucidos. Destas duas partes só a última mantém a sua individualidade através das diferentes gerações, conservando o plano fundamental de estruturação. Que assim é, pude eu observar em variadas circunstâncias, nomeadamente na formação de tubérculos nos ramos aéreos de *Solanum tuberosum* L., nas folhas de *Hedera Helix* L. após a destruição do floema caulinar e ainda nos casos de infecção por virus.

O enfartamento exagerado dos grânulos amilogéneos dos cloroplastídios determina a formação dos cloro-amiloplastídios, os quais, perdendo a grana, se transformam em amiloplastídios. A perda da grana só terá lugar nos casos de infecção ou quando aqueles organitos se encontrem prote-

gidos contra a acção da luz por pigmentos que absorvam as radiações directamente interessadas: caso dos tubérculos de *Solanum tuberosum* L. Nas folhas de *Hedera* e de *Solanum tuberosum* L., em que nenhuma destas condições se verifica, os cloro-amiloplastídios mantêm-se indefinidamente até à morte do órgão.

Relativamente aos cromoplastídios grassa uma confusão terrível: chega a não se saber o que sejam. O caso precisa ser estudado convenientemente a fim de se assentar no que devemos entender por essa categoria de organitos, excluindo dela certas reservas carotinóides, produto de desintegração dos amiloplastídios.

VI — RESUMO E CONCLUSÕES

1 — O problema da origem dos plastídios, sob o ponto de vista técnico, foi tratado de um modo duplamente original.

2 — A distinção entre plastídios e condriosomas foi realizada logo na fixação, pelo emprego de fixadores à base de ácido acético: aceto-resistência dos diversos elementos constituintes de linhagem plastidial.

3 — O método de coloração preferido, dada a falta de especificidade dos chamados métodos mitocondriais, foi o *Tanino-ferro-III*, que não corando as mitocôndrias animais, não deve, lògicamente, corar as suas congéneres vegetais.

4 — Os plastídios mostram, pelo contrário, uma tanofília, primária e secundária, incontestável, a qual revela, além disso, uma homogeneidade do plano de organização das diversas categorias de plastídios.

5 — Esta tanófila secundária afecta, nos amilo-cloro-, cloro-amilo- e cloroplastídios, não só a grana, como os

grânulos amilogéneos, isto é, dois dos seus constituintes completamente distintos.

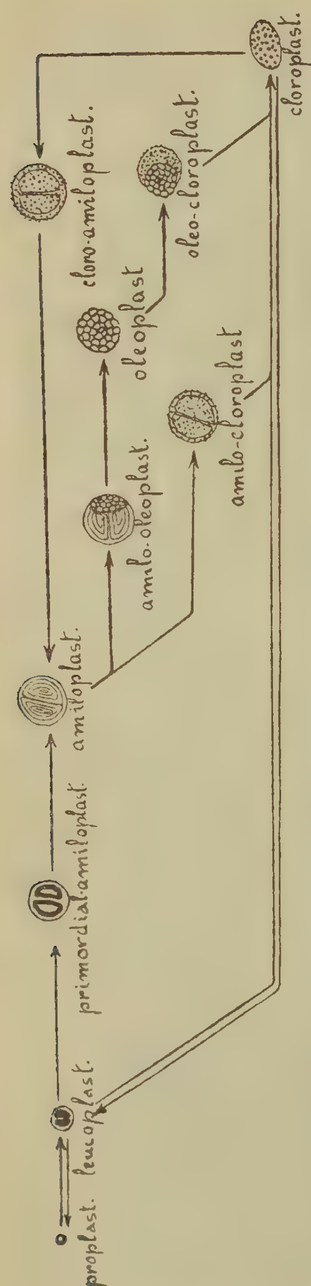


Fig. 6 — Esquema-resumo das transformações observadas, nos diversos elementos da linhagem plastidial, no decurso do presente trabalho. As setas indicam o sentido dessas transformações.

6 — As espécies aqui estudadas, foram: *Culcita macrocarpa* Pr., *Solanum tuberosum* L. e *Iris germanica* L.

7 — De *Culcita macrocarpa* Pr. estudou-se completamente o ciclo de desenvolvimento, chegando-se à conclusão de que não havia quebra de continuidade na linhagem plastidial.

8 — A formação anormal de cloroplastídios, pela exposição à luz dos tubérculos de *Solanum tuberosum* L. e rizomas de *Iris germanica* L. levou-me à convicção de que estes organitos têm uma origem mista: a parte verde, neoformada, resultaria do citoplasma, a parte interna, incolor, proviria de um leuco-, amilo- ou óleoplastídio.

9 — O ciclo evolutivo dos diversos elementos da linhagem plastidial encontra-se esquemàticamente resumido na Fig. 6.

VII — BIBLIOGRAFIA

Altmann, R.

1890 *Die Elementarorganism und ihre Beziehungen au den Zellen,* Leipzig.

Atkinson, L. R.

1938 *Manual of Pteridology,* 196, The Hague.

Baker, J. R.

1933 *Cytological Technique,* Mathuen & C°, Ltd., London.

Belzung, E.

1887 *Ann. Sci. Nat. Bot.,* **5-6,** 179.
1891 *Ann. Sci. Nat. Bot.,* **13,** 1.

Benda, C.

1902 *Erg. Anat. Entw.,* **12,** 743.
1927 *Krause's Enzyklopädie.*

Bensley, R. R.

1911 *Amer. J. Anat.,* **12,** 797.

Carnoy, J. B.

1886 a *La cellule,* **3,** 1.
1886 b *La cellule,* **3,** 227.

Doutreligne, J.

1935 *Proc. Acad. Amsterdam,* **38,** 886.

Eames, A. J.

1936 *Morfology of Vascular Plants,* McGraw-Hill Book C°, Inc., New York and London.

Eames, A. J. & MacDaniels, L. H.

1925 *An Introduction to Plant Anatomy,* McGraw-Hill Book C°, New York and London.

Emberger, L.

1920 *Compt. Rend. Acad. Sci. Paris,* **170,** 282.
1928 *Bull. Soc. Bot. France,* **75,** 696.

Frey-Wyssling, A.

1938 *Submikroskopische Morphologie des Protoplasmas und seiner Derivate,* Borntraeger, Berlin.

Gattenby, J. B.

1917 a *Quart. J. Micr. Sci.,* **62,** 407.
1917 b *Quart. J. Micr. Sci.,* **62,** 555.

GEITLER, L.

1934 *Grundriss der Zytologie*, Borntraeger, Berlin.

GONÇALVES DA CUNHA, A.

1934 *Bull. Soc. Portug. Sci. Nat.*, **12**, 19.

GUILLIERMOND, A.

1911 a *Compt. Rend. Acad. Sci. Paris*, **153**, 290.
1911 b *Compt. Rend. Acad. Sci. Paris*, **153**, 1492.
1941 *Précis de Biologie Végétale*, Massen & C.ie, Paris.

HEITZ, E.

1932 *Planta*, **18**, 618.
1936 *Planta*, **26**, 616.

JOHANSEN, D. A.

1940 *Plant Microtechnique*, McGraw-Hill Book C°, Inc., New York and London.

LEWITSKY, G.

1910 *Ber. d. deut. bot. Ges.*, **28**, 538.

MENKE, W. & KÜSTER, J. H.

1938 *Protoplasma*, **30**, 283.

MEYER, A.

1883 *Das Chlorophyllkorn*, Felix, Leipzig.

MIKOSCH, C.

1885 *Sitzungsber. d. k. Akad. d. Wiss. Wien*, **92**, 168.

PIRES DE LIMA, A. & REZENDE-PINTO, M. C. DE

1945 *Bol. Soc. Brot.*, **19**, 471.

RABINOWITCH, E. I.

1945 *Photosynthesis and Related Processes*, Interscience Publishers, Inc., New York.

RANDOLPH, L. F. W.

1922 *Bot. Gaz.*, **73**, 337.

REZENDE-PINTO, M. C. DE

1943 *Bol. Soc. Brot.*, **17**, 93.
1946 a *Bull. Hist. Appliquée*, N.° 1, 11.
1946 b *Anais F. C. Porto*, **31**, 121.
1946 c *Anales del Jardim Bot. Madrid*, **6**, 123.
1947 *Stain Technology*, **22**, 3.

REZENDE-PINTO, M. C. DE & LEMOS PEREIRA, A.

1947 *Portugaliae Acta Biologica*, **2**, (?).

ROMEIS, B.
1928 *Guia Formulario de Técnica Histológica,* Ed. Labor S. A., Barcelona.

SALAZAR, A. L.
1920 *Comp. Rend. Soc. Biol.,* **81**, 1655.
1941 *Trav. d. «Centro de Estudos Microscópicos»,* **1**, 5.
1943 *Anat. Anz.,* **94**, 284.
1944 *Stain Technology,* **19**, 131.
1945 *«Centro de Estudos Microscópicos do Instituto para a Alta Cultura»,* Universidade do Porto, Portugal.
1947 *Stain Technology,* **21**, 149.

SCHIMPER, A. F. W.
1885 *Ja. Bot.,* **16**, 1.

SENJANINOVA, M.
1928 *Zeit. f. Zell. u. Mikros. Anat.,* **6**, 493.

WATTIEZ, N. & STERNON, F.
1935 *Éléments de Chimie Végétale,* Massen & C.ie, Paris.

WERMEL, E.
1925 *A. Russ. Prot.,* **4**, 1.

WETTSTEIN, R. VON
1944 *Tratado de Botánica Sistemática,* Ed. Labor S. A., Barcelona.

ZETZSCHE, F.
1933 *Handbuch der Pflanzenanalyse,* **2**, 205.

ÍNDICE

Condições de assinatura da "Brotéria"

(Pagamento adiantado)

As condições de assinatura a partir de 1948 são as seguintes:

Portugal, Colónias, Espanha e Brasil: — Série de Ciências Naturais, 60$00; Série de Cultura Geral, 90$00; as duas séries conjuntas, 140$00. A estas importâncias acresce a despesa que se fizer com cobranças não realizadas, ou outras despesas com estas.

Estrangeiro (Convénio Postal): — Série de Ciências Naturais, 65$00; Série de Cultura Geral, 100$00. (Sem Convénio Postal): — Série de Ciências Naturais, 75$00; Série de Cultura Geral, 110$00.

Assinantes beneméritos da BROTÉRIA (*)

---

† *Ex.mo Rev.mo Sr. D. Joaquim Rodrigues Lima, Arcebispo de Bombaim.*
Ex.mo Rev.mo Sr. D. João de Deus Ramalho, Bispo de Macau.
Rev.o P.e Camilo Torrend, Baía (Brasil).
Rev.o P.e Francisco José Galvão, Braga.
Rev.o P.e Simon Tang, Shiu-Hing (Canton, China).
Rev.o P.e Torcato Cabral Ribeiro, Colégio, Caldas da Saúde (Minho).
Sr.a D. Amélia Capelo Franco, Capinha (Beira Baixa).
Sr. Dr. Alberto Martins, S. Paulo (Brasil).
Sr. Dr. António J. de Almeida Coutinho e Lemos Ferreira, Porto. Também especial benfeitor da *Brotéria.*
Sr. Dr. Domingos Megre, Aguas (B. B.).
Sr. Dr. José de Almeida Eusébio, Covilhã.
Sr. Dr. José J. de Andrade Albuquerque de Betencourt, Ponta Delgada (Açores).
Sr. Dr. José Pequito Rebelo, Gavião (Alentejo). Também especial benfeitor da *Brotéria.*
Sr. Dr. Júlio de Melo e Matos, Porto.
Sr. Dr. Manuel Antunes Barradas, Vila Pery (Moçambique).
Sr. Dr. Nuno de Lacerda Ravasco, Moura (Alentejo).
Sr. Dr. Sebastião do Rosário Sarafana, Figueira da Foz.
Sr. Dr. Sebastião dos Santos Pereira Vasconcelos, Porto.
Sr. António Augusto Nogueira da Silva, Porto.
Sr. Bento de Morais Sarmento, Porto.
Sr. Francisco Tavares Proença, Castelo Branco.
Sr. Gustavo Mathieu Snoeck, Baía (Brasil).
Sr. José Coimbra Pacheco, Casa «Pafil», Porto.
Sr. José da Fonseca Castel-Branco, P. de Rio de Moinhos (B. B.).
Sr. José Maria Ferreira Delgado, Vila Franca de Xira.
Sr. José Maria de Proença de Almeida Garrett, Castelo Branco.
Sr. Óscar César Santos Matos, Rio de Janeiro (Brasil).
Sr. Tito Lívio Torres, Porto.

No Brasil representa em tudo a Revista o sr. P.e João Ferreira Rodrigues, Colégio António Vieira, Baía.

(*) São **beneméritos** da **BROTÉRIA** os assinantes que contribuem com uma ou mais prestações, no espaço de um ano, no valor de 3.000$00; tem jus a ser o seu nome publicado para **sempre,** em todos os fascículos desta Revista e recebê-la, sem mais pagamento, durante a sua vida.